



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

“Efecto diurético de los extractos etanólico y acuoso de *Ilex guayusa loes* (guayusa) en ratas albinas hembras”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Andy Richard ERAZO AZURÍN

ASESORES

Mg. César Máximo FUERTES RUITÓN

Mg. Luis Alberto ROJAS RÍOS (Coasesor)

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Erazo A. Efecto diurético de los extractos etanólico y acuoso de *Ilex guayusa loes* (guayusa) en ratas albinas hembras [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2020.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional):

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio):

0000-0002-6170-3549

0000-0003-2531-7749

DNI del autor:

44557109

Grupo de investigación:

NATURAL RESOURCES RESEARCH

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

AUTOFINANCIADO

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas

FACULTAD FARMACIA Y BIOQUIMICA – UNMSM –CERCADO DELIMA

LIMA - PERU

Año o rango de años que la investigación abarcó:

ABRIL 2001 HASTA JULIO 2019



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**EFFECTO DIURÉTICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO Y ACUOSO DE *Ilex guayusa* Loes
(guayusa) EN RATAS ALBINAS HEMBRAS**

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

ANDY RICHARD ERAZO AZURÍN

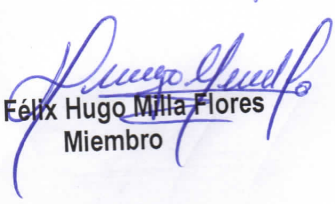
Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECISEIS (16) MUY BUENO

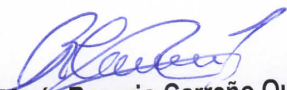
en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 14 de febrero de 2020.


Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Presidente


Mg. Félix Hugo Milla Flores
Miembro


Mg. Francisco Javier María Ramírez Cruz
Miembro


Q.F. María Rosario Carreño Quispe
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



DEDICATORIA

A mi madre Valentina, porque durante toda su vida se preocupó por mi bienestar y me brindó las herramientas necesarias para el desarrollo de mi vida profesional, su sinceridad y sus consejos fueron vitales; a mi padre Régulo, quien desde el cielo me dio protección y fuerzas para continuar; a mi hija Nassia Valentina, quien con su sonrisa y cariño me brindó la fortaleza para continuar día a día e hizo posible que concluya con este proyecto; a mi novia y madre de mi hija, Rocío quien con su amor me otorgó cariño y afecto en el tiempo que estamos juntos; a mis hermanos Ana, Glenda y Alex, a mis sobrinos y cuñados; infinitas veces tuve angustia en este proceso y aunque no siempre se los dije, son parte importante en mi vida profesional.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por haberme permitido llegar hasta aquí, a pesar de las pruebas difíciles que he tenido en el camino siempre he podido superarla. A mis asesores, el Dr. César Fuertes y el Dr. Luis Rojas; nada hubiera sido posible sin el apoyo de ambos en la culminación de mi Tesis. Un agradecimiento también al Dr. Javier Ramírez, quien me brindó su apoyo y asesoramiento en la ejecución de la parte experimental; y un agradecimiento especial a la Gerencia de la Empresa Distribuidora Médica Diagnóstica (DMD), quienes me brindaron las facilidades en el trabajo para que mi Tesis culminara.

ÍNDICE

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTO	3
ÍNDICE	4
TABLAS	7
FIGURAS	9
ANEXO	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
ABREVIATURAS	13
I: INTRODUCCIÓN	14
1.1. Objetivos	15
1.1.1. Objetivo general	15
1.1.2. Objetivos específicos	15
II: MARCO TEÓRICO	16
2.1. Antecedentes	16
2.1.1. Antecedentes internacionales	16
2.1.2. Antecedentes nacionales	20
2.2. Aspectos botánicos del <i>Ilex guayusa</i> Loes (guayusa)	21
2.2.1. Clasificación taxonómica	21
2.2.2. Historia, Usos tradicionales y Distribución	21
2.2.3. Descripción botánica	22
2.3. Bases Teóricas	23
2.3.1. Fisiología renal	23
2.3.2. Anatomía renal	23
2.3.3. Nefrona	24
2.3.4. Funciones del riñón	24
	4

2.3.5. Fisiopatología	26
2.3.6. Diuréticos	27
2.3.7. Clasificación de las drogas diuréticas	27
2.3.7.1. Diuréticos de alta potencia	27
2.3.7.2. Diuréticos de potencia moderada	29
2.3.7.3. Diuréticos de baja potencia	30
2.3.8 Edema	32
III: METODOLOGIA EXPERIMENTAL	34
3.1. Área de Estudio	34
3.2. Población	34
3.3. Muestra	34
3.3.1. Tipo de muestreo	34
3.4. Animales de experimentación	35
3.5. Consideraciones éticas	35
3.6. Diseño Experimental	35
3.7. Materiales y métodos	35
3.7.1. Material biológico	35
3.7.2. Material básico de laboratorio	36
3.7.3. Equipos	36
3.7.4. Materiales de experimentación	36
3.7.5. Fármaco	36
3.8. Recolección de la planta	37
3.9. Secado	37
3.9.1. Fundamentos del secado	37
3.9.2. Proceso de secado	38
3.10. Análisis Fitoquímico	38
3.11. Obtención del extracto acuoso	39

3.11.1 Determinación del porcentaje de rendimiento (extracto acuoso)	39
3.12. Obtención del extracto etanólico	40
3.12.1 Determinación del porcentaje de rendimiento (extracto etanólico)	40
3.13. Preparación de las concentraciones de extractos	41
3.13.1. Cálculo de Dosis	41
3.13.2. Cálculo del volumen de administración de los extractos	43
3.14. Determinación del efecto diurético	48
3.15. Porcentaje de diuresis en relación al blanco	50
3.16. Acción diurética de los grupos de tratamiento	50
3.17. Análisis estadístico	51
IV: RESULTADOS	52
4.1. Análisis de materia prima (Hojas <i>Ilex guayusa</i> Loes)	52
4.1.1. Análisis de secado (Hojas <i>Ilex guayusa</i> Loes)	52
4.1.2. Análisis Fitoquímico (hojas <i>Ilex guayusa</i> Loes)	53
4.2. Análisis de resultados de extractos	55
4.3. Análisis de la actividad diurética	66
4.4. Análisis Estadístico - Resultados	67
4.4.1. Análisis estadístico: Extracto acuoso vs Extracto etanólico	67
4.4.2. Análisis Estadístico del Grupo Control: Extracto acuoso	68
4.4.3. Análisis Estadístico Grupo de Control Extracto Etanólico	71
V: DISCUSIÓN	75
VI: CONCLUSIONES	79
VII: RECOMENDACIONES	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de extractos a preparar	42
Tabla 2. Cantidad de suero fisiológico (NaCl 0,9 %)	42
Tabla 3. Dosis de furosemida (20 mg/kg)	43
Tabla 4. Cantidad de extracto acuoso (50 mg/kg)	43
Tabla 5. Cantidad de extracto acuoso (100 mg/kg)	44
Tabla 6. Cantidad de extracto acuoso (200 mg/kg)	44
Tabla 7. Cantidad de extracto acuoso (400 mg/kg)	45
Tabla 8. Cantidad de extracto acuoso (800 mg/kg)	45
Tabla 9. Cantidad de extracto etanólico (50 mg/kg)	46
Tabla 10. Cantidad de extracto etanólico (100 mg/kg)	46
Tabla 11. Cantidad de extracto etanólico (200 mg/kg)	47
Tabla 12. Cantidad de extracto etanólico (400 mg/kg)	47
Tabla 13. Cantidad de extracto etanólico (800 mg/kg)	48
Tabla 14. Cantidad de extracto administrado por grupo de tratamiento	50
Tabla 15. Pérdida de peso en el método de secado al ambiente	53
Tabla 16. Análisis fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso	54
Tabla 17. Volumen de orina de control negativo (NaCl 0,9 %)	55
Tabla 18. Volumen de orina de extracto acuoso (50 mg/kg)	56
Tabla 19. Volumen de orina de extracto acuoso (100 mg/kg)	56
Tabla 20. Volumen de orina de extracto acuoso (200 mg/kg)	57
Tabla 21. Volumen de orina de extracto acuoso (400 mg/kg)	57
Tabla 22. Volumen de orina de extracto acuoso (800 mg/kg)	58
Tabla 23. Volumen de orina de control positivo – furosemida (20mg/kg)	58
Tabla 24. Volumen de orina de extracto etanólico (50 mg/kg)	59
Tabla 25. Volumen de orina de extracto etanólico (100 mg/kg)	59
Tabla 26. Volumen de orina de extracto etanólico (200 mg/kg)	60
Tabla 27. Volumen de orina de extracto etanólico (400 mg/kg)	60
Tabla 28. Volumen de orina de extracto etanólico (800 mg/kg)	61
Tabla 29. Media de volumen de orina por grupo de tratamiento	61
Tabla 30. Porcentaje de diuresis respecto al blanco (NaCl 0,9%)	63
Tabla 31. Porcentaje de diuresis respecto al control positivo (furosemida)	65
Tabla 32. Actividad diurética	66

Tabla 33. Análisis de varianza	67
Tabla 34. Promedio de volúmenes de orina	68
Tabla 35. ANOVA de un factor en extracto acuoso	68
Tabla 36. Comparaciones múltiples – Extracto acuoso	69
Tabla 37. Promedio de Volumen de orina	70
Tabla 38. Promedio de volumen de orina	71
Tabla 39. ANOVA de un factor en extracto etanólico	71
Tabla 40. Comparaciones múltiples - Extracto etanólico	72
Tabla 41. Promedio de volumen de orina – Prueba de Tukey	73

FIGURAS

Fig. 1. Mapa de distribución de <i>Ilex guayusa</i> L., en Colombia, Ecuador y Perú basado en registros históricos	22
Fig. 2. Hojas y tallos de <i>Ilex guayusa</i> Loes (Comunidad: Awajún)	22
Fig. 3. Diuréticos de asa, diurético de límite alto	29
Fig. 4. Antagonistas de la aldosterona; diuréticos ahorradores de potasio	30
Fig. 5. Localización de la zona donde se realizó la recolección de hojas	37
Fig. 6. Ensayos realizados al extracto acuoso	39
Fig. 7. Ensayos realizados al extracto etanólico	41
Fig. 8. Fotografías de acondicionamiento y procedimiento de experimento en ratas albinas hembras de la cepa Holtzman	49
Fig. 9. Proceso de secado de hojas de <i>Ilex guayusa</i> Loes	52
Fig.10. Fotografías de resultados de marcha fitoquímica en extracto acuoso (izquierda) y extracto etanólico (derecha)	54
Fig. 11. Promedio de los volúmenes (mL) al final del ensayo de diuresis a diferentes concentraciones de los extractos acuoso y etanólico.	62
Fig. 12. Media de volumen de orina por grupo de tratamiento - Resumen	62
Fig. 13. Porcentaje de diuresis respecto al blanco	64
Fig. 14. Porcentaje de diuresis respecto a la furosemida	65
Fig. 15. Promedio de volumen de orina vs Dosis de extracto acuoso	70
Fig. 16. Promedio de volumen de orina vs Dosis de extracto etanólico	74
Fig. 17. Resumen de volúmenes de orina de ambos extractos.	74

ANEXO

Anexo 01. Certificación de Identificación Botánica	85
Anexo 02. Certificación Sanitaria (INS)	86
Anexo 03. Protocolo de Análisis	87

RESUMEN

El objetivo planteado fue encontrar el efecto diurético de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de la planta amazónica *Ilex guayusa* Loes (guayusa) en ratas albinas hembras de la cepa Holtzman. La vía de administración fue oral, se emplearon para el experimento 72 ratas albinas con un peso promedio de 200 – 250 g, divididas en 12 grupos de 6 ratas por grupos como el grupo control con cloruro de sodio al 0,9%, furosemida y ambos extractos a las dosis 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg y 800 mg/kg. Para determinar el efecto diurético se utilizaron las jaulas metabólicas individuales midiendo el volumen de orina excretados. Los resultados obtenidos del grupo control con furosemida y el grupo control con cloruro de sodio 0,9% fueron comparados con los administrados en diferentes dosis de extractos acuoso y etanólico teniendo en cuenta el peso de cada rata. La excreción urinaria se midió a la 1h, 2h, 4h y 6h después de administrar los extractos y se pudo comprobar el efecto diurético de los extractos acuoso y etanólico la cual tuvo una relación directa con respecto a las dosis. El grupo control con furosemida tiene su máximo pico en la primera hora después de la administración, mientras que las muestras evaluadas lo manifiestan a la hora y a la segunda hora de empezado el experimento, teniendo su máximo pico a la dosis de 400 mg/kg, no obstante, no se encontraron diferencias significativas. Posteriores investigaciones son necesarias para dilucidar el mecanismo del efecto diurético de los extractos de *Ilex guayusa* Loes (guayusa).

Palabras clave: Etanólico, acuoso, diuréticos, *Ilex guayusa* Loes, guayusa, Holtzman, albinas, furosemida.

ABSTRACT

The proposed goal was to find the diuretic effect of the aqueous and ethanolic extracts of the leaves of the Amazonian plant *Ilex guayusa* Loes (guayusa) in female albino rats of the Holtzman strain. The route of administration was oral, 72 albino rats with an average weight of 200 – 250 g were used for the experiment, divided into 12 groups of 6 rats per group such as the control group with 0.9% sodium chloride, furosemide and both extracts at doses 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg and 800 mg/kg. Individual metabolic cages were used to determine the diuretic effect by measuring the volume of excreted urine. The results obtained from the control group with furosemide and the control group with sodium chloride 0.9% were compared with those administered in different doses of aqueous and ethanol extracts taking into account the weight of each rat. Urinary excretion was measured at 1h, 2h, 4h and 6h after administering the extracts and could be checked diuretic effect of aqueous and ethanolic extracts which had a direct relationship with respect to dosages. The control group with furosemide has its peak in the first hour after administration, while the evaluated samples show it at the hour and the second hour of starting the experiment, having its maximum peak at the dose of 400 mg/kg, however, no significant differences were found. Further research is necessary to elucidate the mechanism of the diuretic effect of Extracts of *Ilex guayusa* Loes (guayusa).

Keywords: Ethanolic, aqueous, diuretics, *Ilex guayusa* Loes, guayusa, Holtzman, albinas, furosemide.

ABREVIATURAS

- g : Gramo
- h : Hora
- Kg : Kilogramo
- mg : Miligramo
- L : Litro
- Ac : Acuoso
- Et : Etanólico
- mL : Mililitro
- cm : Centímetro
- µm : Micrómetro
- DL : Dosis Letal
- ADH : Hormona antidiurética
- FG : Filtración Glomerular
- AH : Asa de Henle
- TCD : Túbulo contorneado distal
- TCP : Túbulo contorneado proximal
- TC : Túbulo Colector
- EA : Extracto Acuoso
- EE : Extracto Etanólico
- °C : Grados Celsius
- AD : Acción Diurética
- EU : Excreción Urinaria

I: INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia los humanos hemos adquirido múltiples beneficios de las plantas, debido a sus diversas propiedades en campos como medicina, alimento e industrial. A medida que nuestros antepasados aprendieron a reconocer y consumir las plantas medicinales; la salud personal y grupal en las tribus podía avanzar. La medicina tradicional se convertiría entonces en parte importante de cada civilización debido al amplio uso de plantas medicinales (1). La Amazonía peruana es un área que concentra una gran biodiversidad en relación a la del resto del planeta y por su gran variedad de plantas se convierte en una fuente de interés constante, especialmente para el desarrollo de nuevos bienes de consumo tanto en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Entre ellos tenemos el uso terapéutico de algunas plantas medicinales de nuestra Amazonía, como el uso antihipertensivo, antiedematoso, entre otros. La hipertensión es un trastorno que es considerado un problema muy relevante en la salud pública, ya que afecta a 1130 millones de individuos a nivel mundial y en el 2015 se calculó que uno por cada 5 varones tiene este trastorno. Además, es una de las principales causas de muerte prematura. (2) En el Perú la prevalencia en personas con 15 años a más tanto en el 2016 y 2017 fue de 17,6 % y 18,6 % respectivamente (3). Se estima que la hipertensión produce cerca de 9,4 millones de muertes anuales a nivel mundial por enfermedades cardiovasculares (4). La diuresis es un método eficaz para combatir la hipertensión y el uso de plantas medicinales para ello es la única fuente de salud para algunos estratos sociales, (5) pero mucha de la práctica de medicina tradicional herbaria no han sido validadas con el rigor científico.

El presente trabajo de investigación versa sobre: “EFECTO DIURÉTICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO Y ACUOSO DE *Ilex guayusa* Loes (GUAYUSA) EN RATAS ALBINAS HEMBRAS”. Se eligió el tema en mención dado que existe la necesidad de probar la efectividad diurética de las hojas de *Ilex guayusa* Loes procedente de la Amazonía peruana. Numerosos estudios de investigación han demostrado que las plantas pueden ser tan efectivas como los medicamentos sintéticos, presentando grandes ventajas con respecto a estos. En muchos países se trata de aprovechar los conocimientos empíricos de la población sobre el uso de las plantas naturales para validar su actividad terapéutica y crear productos alternativos como medicamentos, jarabes, infusiones, etc; que no solo sean menos tóxicos, sino también más económicos. El Perú, debido a su ubicación geográfica

cuenta con una variada producción de cultivos amazónicos y andinos; entre ellos la planta de *Ilex guayusa* Loes, especie vegetal de gran importancia económica, cultural y terapéutica cuyo uso es muy reducido a nivel nacional. En este sentido la planta de *Ilex guayusa* Loes, también conocida como guayusa, guañusa, huayusa, aguayusa y wuayusa es una planta milenaria que se encuentra en la cuenca amazónica de Colombia, Ecuador y Perú (Fig.1), ubicados en la llamada Amazonía andina, que se caracteriza por su riqueza y biodiversidad de importancia para sectores como: el alimenticio, farmacéutico y cosmético. (6,7)

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

- Determinar el efecto diurético de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Ilex guayusa* Loes.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obtener los extractos acuoso y etanólico por maceración de hojas de *Ilex guayusa* Loes.
- Determinar qué dosis de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Ilex guayusa* Loes presentará mejor efecto diurético en ratas albinas.
- Comparar el efecto diurético del grupo control positivo con los grupos administrados con extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Ilex guayusa* Loes.
- Comparar la excreción volumétrica del grupo control negativo con los grupos administrados con extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Ilex guayusa* Loes.

II: MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Antecedentes internacionales

Younis, W. et al (2020). Realizaron una investigación titulada "Role of the NO/cGMP pathway and renin-angiotensin system in the hypotensive and diuretic effects of aqueous soluble fraction from *Crataegus songarica* K. Koch". Se evaluó la eficacia y el mecanismo subyacente a la acción hipotensiva y diurética de *C. songarica* en ratas normotensas y determinar los componentes de los extractos por LC-DAD-MS. En primer lugar, se determinó el perfil fitoquímico y el potencial antioxidante de los extractos de *C. songarica*. Luego, para evaluar los cambios en la presión arterial, diferentes grupos de ratas normotensas anestesiadas fueron tratadas por vía intravenosa con extracto crudo, soluble en agua, y fracciones solubles de n-butanol de *C. songarica*. Se evaluaron los efectos diuréticos de CS-Cr (100–500 mg/kg, po), AS-CS (100–300 mg/kg, po) y BS-CS (100–300 mg/kg, po) en comparación con hidroclorotiazida (HCTZ, 10 mg/kg, po). El volumen urinario, sodio, potasio y pH se estimaron en la muestra recogida durante 6 h de ratas cargadas con solución salina. Usando antagonistas o inhibidores farmacológicos, determinamos la participación de acetilcolina, prostaglandinas y óxido nítrico en la acción hipotensiva y diuresis inducida por *C. songarica*. Además, se evaluaron in vitro las actividades de la enzima convertidora de angiotensina, la anhidrasa carbónica eritrocitaria y la Na⁺/K⁺/ATPasa renal. A partir de los análisis LC-DAD-MS, se detectaron treinta y nueve compuestos, que muestran un perfil químico complejo y una actividad antioxidante expresiva "in vitro". El tratamiento agudo con CS-Cr, AS-CS y BS-CS exhibió un potencial hipotensor y diurético significativo en ratas normotensas. Sin embargo, AS-CS produjo hipotensión dependiente de la dosis más potente y significativa en ratas normotensas, y también produjo efectos diuréticos y saluréticos altamente significativos. A pesar de los cambios en la excreción urinaria de electrolitos, los niveles plasmáticos de sodio y potasio no cambiaron. El tratamiento previo con atropina y L-NAME redujo significativamente la acción hipotensiva y diurética de AS-CS en ratas normotensas. Además, el tratamiento de 7 días con AS-CS también resultó en una actividad inhibidora de la ECA significativa. Los autores concluyeron que esta investigación apoya y extiende

el uso etnomedicinal de *C. songarica* como agente diurético e hipotensor. Los resultados mostraron que AS-CS de *C. songarica* podría presentar compuestos responsables de actividades hipotensivas y diuréticas sin signos de toxicidad, y estos efectos podrían involucrar la vía del óxido nítrico activada por receptores muscarínicos o por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina. (8)

Reddy, P. et al (2019). En una investigación titulada “Evaluation of diuretic potential of petroleum ether extract of *Dendrophthoe falcata* leaves in wistar rats”. El objetivo planteado en el presente estudio se realizó para determinar el efecto diurético del extracto de éter de petróleo de las hojas de *Dendrophthoe falcata* (EEDF) en ratas wistar. El extracto de éter de petróleo de las hojas de *Dendrophthoe falcata* se administró a ratas experimentales a 250 mg/kg y 500 mg/kg y se comparó con furosemida (20 mg/kg, p.o) como estándar. Los parámetros medidos para la actividad diurética fueron el volumen total de orina, la concentración de orina en electrolitos como sodio, potasio y cloruro. Las ratas tratadas con dosis de EEDF de 250 mg/kg y 500 mg/kg mostraron un mayor gasto urinario en comparación con el control respectivo y también mostraron efecto dependiente de la dosis. El extracto tiene efecto diurético que apoya el uso etnofarmacológico como diuréticos. Este efecto puede ser explorado en el uso de la planta en el manejo de algunas enfermedades cardiovasculares. (9)

Yakubu, M et al (2019). Realizaron una investigación titulado “Diuretic activity of ethanol extract of *Mirabilis jalapa* (Linn.) leaf in normal male Wistar rats”. Se investigó el extracto de etanol de la hoja *Mirabilis jalapa* a 200, 400 y 600 mg/kg de peso corporal para determinar la actividad diurética en ratas Wistar machos. Se recolectó hoja fresca de *M. jalapa* proveniente de Nigeria. Se usaron treinta ratas macho (231,50 g \pm 13,51 g) fueron asignadas a cinco grupos (A – E) de seis ratas cada uno. Las ratas en el grupo A (control) recibieron 1,0 ml de solución salina fisiológica (el vehículo). Los animales en los grupos B (control positivo), C, D y E recibieron 1,0 ml equivalentes a 100 mg/kg de furosemida, 200, 400 y 600 mg/kg de peso corporal de EEMJL, respectivamente. Todas las administraciones se realizaron por sonda oral. Los animales fueron monitoreados por indicadores de diuresis durante 5 h utilizando métodos estándar. El extracto de etanol de la hoja de *Mirabilis jalapa* aumentó el volumen de orina ($p < 0,05$), las concentraciones de iones sodio, potasio y cloruro disminuyeron ($p < 0,05$) el peso de las ratas. El extracto de

etanol de la hoja *Mirabilis jalapa* aumentó el pH de la orina, la actividad salinúrica, el índice salinúrico, el índice Na^+ , el índice K^+ , el índice Cl^- , la acción diurética (índice diurético), el índice kaliúrico, el valor de Lipschitz y el porcentaje de carga salina excretada, mientras que la latencia de la micción, disminuyeron el índice natriúrico, la actividad inhibitoria de la anhidrasa carbónica y el índice de inhibición de la anhidrasa carbónica. Los cambios relacionados con el tratamiento de EEMJL en estos parámetros fueron esencialmente similares a los de los animales tratados con furosemida. Los autores concluyeron que la hoja de *M. jalapa* presenta actividad diurética a la dosis de 600 mg/kg. (10)

Salazar-Gómez, a. et al. (2018). En una investigación titulada “Diuretic activity of aqueous extract and smoothie preparation of *Verbesina crocata* in rat”. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad diurética del extracto acuoso de *Verbesina crocata* a diferentes dosis en ratas. El extracto acuoso de *Verbesina crocata* (100 y 400 mg/kg para decocción; 200 y 400 mg/kg para forma de solución), de furosemida se administraron 4 mg/kg y vehículo por vía oral a cada rata. Después de 6 horas en jaulas metabólicas de flujo urinario se evaluaron la tasa de filtración glomerular y el equilibrio electrolítico (iones sodio y potasio). Todas las dosis produjeron un incremento del flujo urinario y la excreción de Na^+/K^+ . La tasa de filtración glomerular (FG) se incrementó solo en el grupo al que se le administró la solución del extracto acuoso de *Verbesina crocata* a la dosis de 400 mg/kg. Estos resultados proporcionan una base que explica el uso tradicional de la medicina popular de esta planta como agente diurético. (11)

Hozaien, H. et al. (2018). En su investigación titulada “Diuretic activity of ethanolic extract of *Panicum repens* L. roots and rhizomes”. La actividad diurética del extracto etanólico de *Panicum repens* se investigó en ratas. Se administró una dosis oral única de 500 mg/kg de extracto de *P. repens* a las ratas, después de 24 h, se estimó el volumen de orina, sus concentraciones de sodio y potasio. El volumen de orina colectado en el grupo al que se le administró por vía oral el extracto a 500 mg/kg fue de $22 \pm 1,46$ mL frente a $16,3 \pm 0,4$ mL del grupo que recibió furosemida. El tratamiento con extracto de *P. repens* causó un aumento significativo en los parámetros probados en comparación con sus controles correspondientes, $p < 0,05$. (12)

Nayak, B et al. (2017). En una investigación titulada “Diuretic activity of flavonoid compound isolated from *Gmelina arborea* fruits extract”. La planta *Gmelina arborea* se ha utilizado tradicionalmente en la India para diversos fines medicinales, como antihelmínticos, diuréticos, antibacterianos, hepatoprotectores, antiinflamatorios, antioxidantes y antidiabéticos. Contiene fitoconstituyentes como alcaloides, carbohidratos, glucósidos de antraquinona, gomas, mucílagos, taninos, compuestos fenólicos y flavonoides. El objetivo del presente estudio es aislar un compuesto del extracto etanólico de *G. arborea* y explorar la actividad diurética del compuesto aislado. Material y métodos: El aislamiento del compuesto se realizó por columna y por métodos cromatográficos de capa delgada. El compuesto aislado se caracterizó por elucidar su estructura por métodos espectroscópicos como la ultravioleta, infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectroscopía de masas. La actividad diurética del compuesto aislado se evaluó mediante métodos de prueba de Lipschitz utilizando ratas Wistar como modelo animal. Análisis estadístico utilizado: todos los datos se verifican estadísticamente significativos mediante el uso de ANOVA unidireccional con un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$). Resultados: Se aisló un compuesto flavonoidal como cristal de color amarillo con punto de fusión $177 \pm 1^\circ \text{C}$ con fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_5$ y nombre IUPAC 5,7-dihidroxi-4-metoxi flavona. El volumen de orina aumentó significativamente en comparación con los grupos de control normales y estándar. La excreción de sodio también aumentó por el compuesto. El efecto diurético del compuesto fue comparable al del patrón de referencia (furosemida). El compuesto aislado es un flavonoide y posee actividad diurética. (13)

Shekshavali, T. et al. (2017). Realizaron una investigación titulada “Evaluation for diuretic activity of *Abutilon indicum* and *Amaranthus spinosus* leaves extracts”. Se estudió la actividad diurética de las hojas de *Abutilon indicum* y *Amaranthus spinosus*. Las fracciones de etanol y metanol mostraron un aumento significativo en la eliminación de orina, mientras que la fracción de acetato de etilo no muestra actividad diurética. Todos los grupos se compararon con el grupo control; Se usó frusemida como fármaco estándar de referencia en esta actividad de detección. El estudio de detección fitoquímica mostró la presencia de flavonoides, saponinas, terpenoides y contenido de esteroides en ambos extractos de plantas. El efecto diurético en todos los extractos puede deberse a fitoquímicos presentes en las fracciones, excepto la fracción de benceno de *A. indicum*. (14)

2.1.2 Antecedentes nacionales

Varillas, A. y Tito, D. (2018). En una investigación descrita en su tesis titulada “Actividad diurética del extracto etanólico de las hojas de matico *Buddleja globosa* en ratas”. El objetivo planteado por los autores fue determinar el efecto diurético de las hojas de la especie vegetal *Buddleja globosa*. La planta utilizada en este estudio fue colectada en Huancavelica. Las hojas secas y pulverizadas fueron maceradas en etanol. El extracto seco resultante fue usado para determinar su efecto diurético. Se distribuyeron 25 ratas en grupos de 5 que fueron codificados como control, furosemida y el extracto al 5, 8 y 12 %. Para este ensayo farmacológico se administró por vía oral suero fisiológico, furosemida y el extracto a 3 concentraciones diferentes a los 5 grupos respectivamente. Luego se administró un volumen equivalentemente a su peso para cada uno de los animales de experimentación. Luego se midió el volumen de orina que excretaron cada una de las ratas durante 6 horas con intervalos de 1 hora. Los resultados mostraron un volumen total de 5,6; 12,04; 9,99; 8,33 y 6,28 mL en los grupos control, furosemida y el extracto al 5, 8 y 12 % respectivamente. Los autores concluyeron que el extracto de las hojas de *Buddleja globosa* presenta efecto diurético. (15)

Bonifaz, N. (2018). En su tesis titulada “Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de la *Persea americana* Mill palta fuerte”. Tuvo por objetivo determinar el efecto diurético de las hojas de *Persea americana*. La planta utilizada en esta investigación fue colectada en Cañete-Lima. Las hojas secas y pulverizadas fueron maceradas con etanol 80 %. El extracto conseguido fue usado para determinar su efecto diurético. Se distribuyeron 25 ratas en grupos de 5 que fueron codificados como control, hidroclorotiazida 50 mg/kg y extracto a 100, 200 y 400 mg/kg. Para este ensayo farmacológico se administró por vía oral suero fisiológico, hidroclorotiazida y el extracto a 3 dosis diferentes a los 5 grupos respectivamente. Luego se administró un volumen equivalentemente a su peso para cada uno de los animales de experimentación. Luego se midió el volumen de orina que excretaron cada una de las ratas durante 6 horas con intervalos de 1 hora. Se evidenciaron 15; 14; 10,5 y 9,7 mL de orina en los grupos hidroclorotiazida 50 mg/kg y extracto a 100, 200 y 400 mg/kg. El autor concluyó que el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de la *Persea americana* presenta actividad diurética. (16)

2.2. Aspectos botánicos del *Ilex guayusa* Loes (guayusa)

2.2.1. Clasificación taxonómica

La sistemática la clasifica de acuerdo al siguiente orden:

REINO	:	Plantae
DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnolopsida
SUBCLASE	:	Rosidae
ORDEN	:	Celastrales
FAMILIA	:	Aquifoliaceae
GÉNERO	:	<i>Ilex</i>
ESPECIE	:	<i>Ilex guayusa</i> Loes.

Nombre Vulgar : “guayusa”

La sistemática ha sido determinada según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist (1981). (ANEXO 01).

2.2.2. Historia, Usos tradicionales y Distribución

Los registros arqueológicos e históricos sugieren que la hoja de guayusa se ha utilizado y comercializado como planta medicinal en la región de los Andes y la Amazonía desde que se encontraron al menos hace 1500 años. (17) La infusión de las hojas de *Ilex guayusa* es usado como tónico muscular, analgésico, antigripal y promotor de la libido.

El género *Ilex* comprende aproximadamente 600 especies, y estas crecen en lugares con altos índices de humedad y precipitación. Si bien la guayusa se consume en Perú por sus efectos estimulantes, la mayoría de las personas informan que lo usan por sus cualidades medicinales. Se sabe que "limpia la sangre" (para eliminar el exceso de azúcares de la sangre), un remedio utilizado para tratar la

diabetes. También se usa comúnmente para limpiar la vagina después del parto para reducir el sangrado posparto. (17)

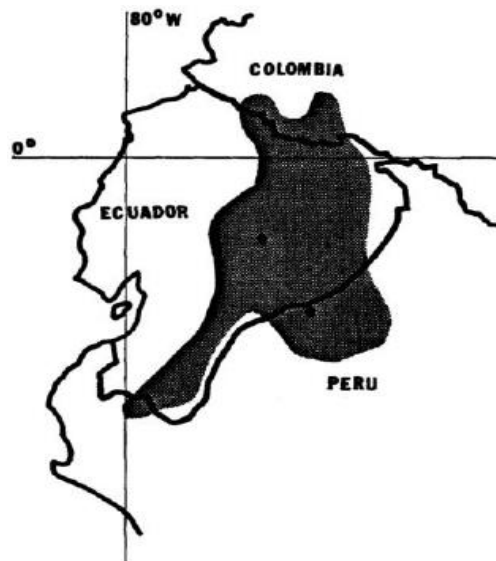


Fig. 1. Mapa de distribución de *Ilex guayusa* L., en Colombia, Ecuador y Perú basado en registros históricos

2.2.3 Descripción botánica

Esta especie forma parte de la familia *Aquifoliaceae*, guayusa es un árbol tropical de hoja perenne que crece hasta 30 metros y es nativo de la región occidental del Amazonas. (7). Sus hojas son ovadas, elípticas, oblongas o lanceoladas; 7-22 cm de largo, 2.5-7 cm de ancho; con un margen dentado (Fig. 2).



Fig. 2. Hojas y tallos de *Ilex guayusa* Loes (Comunidad: Awajún)

2.3 Bases Teóricas

2.3.1. Fisiología renal

El riñón filtra el agua plasmática y los solutos en el glomérulo a una velocidad muy alta (180 L/día) y debe recuperar un porcentaje significativo de la mayoría de estas sustancias antes de su excreción en la orina. Debido a que los mecanismos para la reabsorción de sal y agua difieren en cada uno de los 4 segmentos tubulares principales, los diuréticos que actúan en estos segmentos tienen diferentes mecanismos de acción. (18)

2.3.2. Anatomía renal

Los riñones se encuentran en el espacio retroperitoneal en el abdomen posterior. Un riñón está a cada lado de la columna vertebral entre el nivel de la duodécima vértebra torácica y la tercera lumbar. El ángulo costovertebral (ACV), el punto en el que la parte inferior de la caja torácica se une con la columna vertebral, se usa comúnmente como un punto de referencia externo para encontrar la posición del riñón durante el examen físico. El riñón derecho se encuentra debajo del hígado y se coloca un poco más bajo que el riñón izquierdo. Los riñones están protegidos y rodeados de fuertes músculos de la espalda y los costados, fascia y grasa. Los riñones son algo móviles y pueden lesionarse por actividades de alto impacto, como rebotar a caballo o en una bicicleta de montaña, o por un trauma directo, como podría ocurrir por caídas o traumatismos cerrados. Los riñones drenan la orina hacia los uréteres por flujo de gravedad, y los uréteres proporcionan una acción peristáltica para mover la orina a la vejiga donde se almacena. Las dos partes principales de la vejiga son el cuerpo y el cuello. El cuerpo almacena orina y está formado por un músculo liso conocido como músculo detrusor. El músculo detrusor se extiende en todas las direcciones a lo largo de la vejiga y se contrae como una unidad en respuesta al inicio de potenciales de acción. La vejiga urinaria recoge 300 a 500 mL antes de que los receptores de estiramiento indiquen la necesidad de vaciar la vejiga. La orina es drenada de la vejiga por la uretra cuando los esfínteres internos y externos están relajados. (19)

2.3.3. Nefrona

Cada nefrona está constituida por un túbulo renal y un glomérulo. Los seres humanos tenemos aproximadamente un millón de nefronas en cada riñón. El glomérulo que mide aproximadamente 200 μm , está conformado por una red de capilares glomerulares que se ramifican y poseen una presión hidrostática elevada a diferencia de otros capilares en nuestro sistema.

Se dice que la nefrona es la unidad funcional del riñón. Las nefronas se organizan en paralelo de modo que cada una de ellas debe realizar todo el procesamiento necesario antes de liberar orina en los conductos colectores. Los mecanismos autorreguladores complejos aseguran que la carga de trabajo se distribuya uniformemente entre las numerosas nefronas de los riñones. Como la unidad de la función renal, una nefrona debe cumplir tres funciones principales: (A) filtración de sustancias solubles en agua de la sangre; (B) reabsorción de nutrientes filtrados, agua y electrolitos; y (C) secreción de desechos o exceso de sustancias en el filtrado. Los diferentes segmentos de la nefrona están especializados para lograr cada uno de estos procesos. (19) Cada nefrona se compone de un glomérulo, que incluye una red capilar y la cápsula Bowman, y un túbulo, que incluye el túbulo contorneado proximal (TCP), el Asa de Henle (AH), el túbulo contorneado distal (TCD) y el túbulo colector (TC). El túbulo de nefrona está compuesto por una sola capa de células epiteliales con un lado apical orientado hacia la luz y un lado basolateral hacia el espacio intersticial y los capilares. (20) Las células epiteliales en cada segmento del túbulo están especializadas para ciertas funciones. Casi todas las células en la nefrona tienen un solo cilio que sobresale de la superficie apical hacia la luz del túbulo. Estos cilios son mecanorreceptores y quimiorreceptores que detectan el caudal y la composición del filtrado tubular. (21) La estimulación del cilio desencadena cascadas de señalización dentro de las células del túbulo que regulan la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. (22)

2.3.4 Funciones del riñón

La mayoría de personas saben que los riñones tienen una función importante, ya que al igual que los intestinos, nos permiten eliminar del cuerpo los compuestos de desecho, producto del metabolismo. Otra función importante de los riñones es que

nos permiten controlar la capacidad y composición de líquidos corporales, el cual se mantiene mediante el equilibrio entre los ingresos (debidos a la ingestión y a la producción metabólica) y las salidas (debidas a la excreción o al consumo metabólico) de los riñones. Es importante saber que los riñones ejercen múltiples funciones, entre ellas tenemos: (22)

- **Eliminación de productos de desecho.**

Una función muy importante de los riñones es que nos permiten eliminar las sustancias indeseables producto del metabolismo celular u obtenido en la dieta diaria y que a la vez ya no necesitamos. Las sustancias extrañas en nuestro organismo que no tengan ninguna función, serán eliminadas debido a que no pueden ser utilizados para cumplir otra función entre estos productos tenemos a la urea (metabolismo de los aminoácidos), creatinina (creatinina muscular) y hormonas. Además, todos los fármacos sufren un proceso de metabolización en nuestro cuerpo y los productos que no tienen ninguna acción terapéutica por lo general son eliminados por nuestros riñones. (22)

- **Regulación del equilibrio hídrico - electrolito.**

La función anterior nos permite mantener la homeostasis y ello es necesario para que nuestro cuerpo no sufra alguna alteración en sus funciones. La eliminación de electrolitos y agua deben ser equivalentes a los que son ingeridos para evitar el exceso. (22)

- **Equilibrio de la presión arterial.**

Como se comentó en la anterior función, los riñones cumplen la función de mantener la homeostasis hídrica – electrolito; ello les permite a los riñones además, mediante el sistema renina angiotensina - aldosterona, mantener cantidades regulares de sodio - potasio y volumen de agua extracelular y con ello poder regular la presión arterial. (22)

- **Equilibrio ácido - base.**

Al igual que los pulmones, los riñones también contribuyen con la regulación del equilibrio ácido – base, como únicos medios para eliminar ciertos ácidos. (22)

- **Secreción, metabolismo y excreción de hormonas.**

Secretan la hormona eritropoyetina (mayor producción de eritrocitos), producen la forma activa de la vitamina D (calcitriol), importante como depósito de calcio en nuestro organismo. A su vez, los riñones secretan hormonas importantes para la regulación de la presión arterial como la aldosterona y vasopresina. (22)

- **Gluconeogenia.**

Otra función importante es que los riñones tienen la capacidad de sintetizar glucosa desde algunos aminoácidos y otros intermediarios en situaciones de extenso ayuno. (22)

2.3.5. Fisiopatología

El aumento de la presión hidrostática capilar puede ser el resultado de la obstrucción venosa o la retención de sodio y agua. La obstrucción venosa hace que la presión hidrostática aumente detrás, empujando el líquido desde los capilares hacia los espacios intersticiales. Los coágulos de sangre venosa, la obstrucción hepática, la insuficiencia cardíaca congestiva, la ropa ajustada alrededor de las extremidades y la posición prolongada son causas comunes de obstrucción venosa. La insuficiencia cardíaca congestiva, la insuficiencia renal y la cirrosis hepática son afecciones asociadas con la retención excesiva de sodio y agua, que a su vez causan sobrecarga de volumen, aumento de la presión venosa y edema. El volumen de líquido intersticial excede la capacidad de los linfáticos para devolver el líquido al sistema vascular. La disminución de la presión oncótica plasmática resulta de pérdidas o disminución de la producción de albúmina plasmática. La disminución de la atracción oncótica del líquido dentro del capilar hace que el líquido se mueva hacia el espacio intersticial, lo que resulta en edema. La disminución de la síntesis de proteínas plasmáticas y la disminución de la presión oncótica pueden ocurrir con

enfermedad hepática o desnutrición proteica. Las pérdidas de proteínas plasmáticas ocurren con enfermedades glomerulares del riñón (síndrome nefrótico), hemorragia y drenaje seroso de heridas abiertas o quemaduras. (22)

2.3.6 Diuréticos

Los diuréticos son fármacos que, una vez ingerido, actúa sobre el riñón y como consecuencia posee la capacidad de incrementar el flujo de orina o la diuresis. Adicionalmente, se usan para regular el nivel de líquido corporal, composición de electrolitos en diversas situaciones clínicas, como la presión elevada, problemas cardíacos y renales, etc. Los diuréticos se clasifican según los siguientes criterios: la potencia diurética, la duración del efecto, el lugar de acción y la estructura química o mecanismo de acción. Para el presente trabajo de investigación se utilizó el criterio de Potencia farmacológica o potencia diurética. (23)

2.3.7. Clasificación de las drogas diuréticas

2.3.7.1. Diuréticos de alta potencia

Grupo de diuréticos conocidos como “de techo alto” pues se puede aumentar su efecto al aumentar la dosis. Debido a que actúan sobre la porción de la nefrona llamada Asa de Henle, por tal razón, también son llamados “diuréticos del Asa”. Dada la gran capacidad de absorción de dicha sustancia por el segmento mencionado, estos fármacos son los más eficaces entre todos los demás fármacos de esta categoría. Su acción comienza antes de los 30 minutos por vía oral, y su duración es relativamente leve, de 4-6 horas. (23)

Aspectos químicos:

La furosemida es el agente de bucle prototípico. La furosemida, la bumetanida y la torsemida son derivados de sulfonamida. El ácido etacrínico es un derivado del ácido fenoxiacético; a pesar de no ser una sulfonamida actúa con el mismo mecanismo. Los diuréticos de asa inhiben el cotransporte de sodio, potasio y

cloruro. Los diuréticos de asa son de acción relativamente corta (la diuresis generalmente ocurre durante un período de 4 h después de una dosis).

Mecanismo de acción:

Los diuréticos de asa inhiben el cotransporte de sodio, potasio y cloruro. Los diuréticos de asa son de acción relativamente corta (la diuresis generalmente ocurre durante un período de 4 h después de una dosis). Una dosis completa de un diurético de asa produce una diuresis masiva de cloruro de sodio si la filtración glomerular es normal; el volumen de sangre puede reducirse significativamente. Si la perfusión tisular es adecuada, el líquido del edema se excreta rápidamente. La capacidad de dilución de la nefrona se reduce porque el asa de Henle es el sitio de dilución significativa de orina. La inhibición del transportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ también da como resultado la pérdida del potencial positivo a la luz, lo que también reduce la reabsorción de cationes divalentes. Como resultado, la excreción de calcio aumenta significativamente. El ácido etacrínico es un fármaco uricosúrico moderadamente efectivo si se mantiene el volumen sanguíneo. La presentación de grandes cantidades de sodio al túbulo colector puede ocasionar un importante desperdicio de potasio y excreción de protones; puede producir alcalosis hipopotasémica. (24)

FÁRMACO	ESTRUCTURA	POTENCIA RELATIVA	DISPONIBILIDAD ORAL	$t_{1/2}$ (HORAS)
Furosemida (LASIX)		1	~60%	~1.5
Bumetanida (BUMEX)		40	~80%	~0.8
Ácido etacrínico (EDECRIN)		0.7	~100%	~1
Torseמידا (DEMADEX)		3	~80%	~3.5
Axosemida*		1	~12%	~2.5
Piretanida*		3	~80%	0.6-1.5
Triпамida*		ID	ID	ID

Fig. 3. Diuréticos del asa; diuréticos de límite alto (26)

2.3.7.2 Diuréticos de potencia moderada

Desde el punto de vista terapéutico es uno de los diuréticos más importantes, pues inhiben el transporte de cloruro de sodio. Tiene su acción predominante a nivel del TCD. La tiazida prototípica es la Hidroclorotiazida. (24)

Aspectos químicos:

La hidroclorotiazida, y todos los demás miembros de este grupo son derivados de sulfonamida, sin embargo, algunos derivados carecen del anillo tiazídico en su estructura. (24)

Mecanismo de acción:

Los diuréticos tiazídicos se secretan en la parte recta del TCP como muchos ácidos orgánicos débiles, a pesar de ello actúa principalmente en el TCD. Todas las tiazidas pueden administrarse por vía oral. (24)

2.3.7.3 Diuréticos de baja potencia

Espironolactona:

Estos diuréticos son esteroides sintéticos que evitan la secreción de potasio por antagonismo farmacológico directo de los receptores mineralocorticoides. De igual acción tenemos a la eplerenona, y canrenona. Este último es el principal metabolito activo de la espironolactona, y puede convertirse hidrolíticamente en canrenoato de potasio (Fig.4). (18)

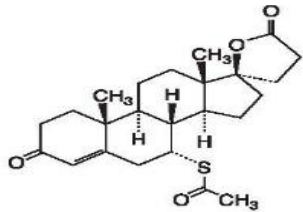
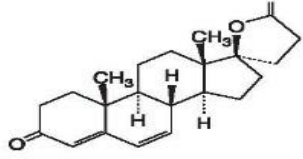
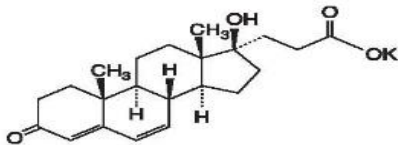
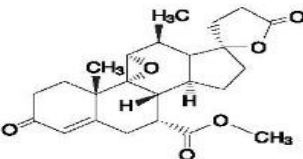
FÁRMACO	ESTRUCTURA	DISPONIBILIDAD ORAL	$t_{1/2}$ (horas)
Espironolactona (ALDACTONE)		~65%	~1.6
Canrenona*		ID	~16.5
Canrenoato de potasio*		ID	ID
Eplerenona (INSpra)		ID	~5

Fig. 4. Antagonistas de la aldosterona; diuréticos ahorradores de potasio (26)

Amilorida y triamtereno:

Ambas drogas causan pequeños aumentos en la eliminación de iones sodio y cloruro y, generalmente, se emplean para contrarrestar a otros diuréticos que aumentan la eliminación de iones potasio. Por esta razón se denominan también diuréticos ahorradores de potasio. Ambas drogas son bases orgánicas, son transportadas por el mecanismo secretor de la base orgánica en el túbulo proximal y tienen mecanismos de acción similares. (18)

Diuréticos osmóticos

El manitol es un diurético osmótico prototípico que se administra por vía intravenosa. Otros medicamentos a menudo clasificados con el manitol que rara vez se utilizan incluyen glicerina, isosorbida (no dinitrato de isosorbida) y urea. Debido a que se filtran libremente en el glomérulo, pero se reabsorben poco del túbulo, permanecen en la luz y "retienen" el agua en virtud de su efecto osmótico. La ubicación principal para esta acción es el TCP. La reabsorción de agua también se reduce en la extremidad descendente del AH y el TC. (18) Casi todos los solutos filtrados se excretan por grandes cantidades a menos que se reabsorban activamente. La excreción de sodio generalmente aumenta porque la velocidad del flujo de orina a través del túbulo se acelera enormemente y los transportadores de sodio no pueden manejar el volumen lo suficientemente rápido. El manitol también tiene la capacidad de disminuir el volumen cerebral y la presión intracraneal al extraer osmóticamente agua del tejido a la sangre. Un efecto similar ocurre en el ojo. (18)

Diuréticos inhibidores de la anhidrasa carbónica

Estos diuréticos son derivados de sulfonamida. Inhiben la anhidrasa carbónica en el borde en el citoplasma. La anhidrasa carbónica también se encuentra en otros tejidos y tiene una función importante en la secreción del líquido cefalorraquídeo y humor acuoso. La acetazolamida inhibe la anhidrasa carbónica en todos los tejidos del cuerpo. (18) El principal efecto renal es la diuresis de bicarbonato (es decir, el bicarbonato de sodio se excreta); el bicarbonato corporal se agota y se produce acidosis metabólica. A medida que se presenta un aumento de sodio en el túbulo

colector cortical, se reabsorbe parte del exceso de sodio y se secreta potasio, lo que resulta en una importante pérdida de potasio. Como resultado del agotamiento del bicarbonato, la excreción de bicarbonato de sodio se ralentiza, incluso con la administración continua de diuréticos, y la diuresis es autolimitada en 2 a 3 días. (25)

Aspectos químicos:

El estudio *in vitro* e *in vivo* realizados con la sulfanilamida evidenciaron en un inicio acidosis metabólica como efecto no deseado, por esta observación se generaron estudios que evidenciaron que la sulfanilamida también tiene esta actividad biológica. El prototipo de este grupo farmacológico es la acetazolamida, fármaco que se ha estudiado de manera más extensa. (24)

Mecanismo de acción:

Su lugar de acción se lleva a cabo en el TCP (sitio del nefrón donde existe mayor cantidad de la enzima anhidrasa carbónica). La acetazolamida es un inhibidor reversible de todas las isoenzimas de la anhidrasa carbónica; sin embargo, para que los efectos seas evidentes, debe inhibirse el 99% de la actividad enzimática. La acetazolamida disminuye la reabsorción de bicarbonato en el TCP, ello provoca que se aumente la eliminación de bicarbonato por la orina acompañado por el Na^+ y K^+ , como resultado de ello hace que se incremente la diuresis.

2.3.8. Edema

El edema es la acumulación excesiva de líquido dentro de los espacios intersticiales. A menudo es un problema de distribución de líquidos y no necesariamente indica un exceso de líquido. En algunas condiciones, los líquidos secuestrados pueden causar edema y deshidratación intravascular. El proceso fisiopatológico del edema está relacionado con un aumento de las fuerzas que favorecen la filtración de líquidos desde los capilares o canales linfáticos hacia los tejidos. Los cuatro mecanismos más comunes son: (26)

- Aumento de la presión hidrostática capilar.
- Disminución de la presión oncótica capilar.
- Aumento de la permeabilidad de la membrana capilar.
- Obstrucción linfática.

III: METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Área de Estudio

Se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología y el Laboratorio del Centro de Producción (CENPROFARMA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM – Jr. Puno N°1002 - Lima – Perú.

3.2 Población

Se trabajaron las hojas de *Ilex guayusa* Loes (guayusa) que crecen en la localidad de La Colmena, Distrito de Namballe, Provincia de San Ignacio, Departamento de Cajamarca (Fig. 5).

3.3 Muestra

Se utilizaron 500 gramos de hojas de *Ilex guayusa* Loes (guayusa), las cuales fueron recolectadas del distrito de Namballe, provincia de San Ignacio, Departamento de Cajamarca, en horas de la mañana y transportadas en un material absorbente y agujereado para evitar su descomposición durante el transporte. Se procedió a su secado hasta peso constante, seleccionándose las que se encuentran en mejores condiciones para posteriormente extenderlas en papel Kraft para evitar su descomposición por causas externas como la humedad con posterior proliferación de hongos y/o bacterias que vayan afectar el estudio al momento de obtener la extracción.

3.3.1 Tipo de muestreo

Por conveniencia, porque se seleccionaron las hojas con mejor aspecto y tamaño para obtener condiciones óptimas durante la investigación.

3.4 Animales de experimentación

El modelo experimental se llevó a cabo con 72 ratas albinas hembras que fueron suministradas por el Instituto Nacional de Salud (INS) divididos en 12 grupos de los cuales un grupo fue para el control negativo, 5 grupos para extracto acuoso, un grupo para el control positivo y 5 grupos para extracto etanólico, su descripción de especie, género y peso se definirá con el certificado y datos obtenidos del Instituto Nacional de Salud (INS). Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM con las siguientes condiciones: ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, condición ambiental estándar (25 ± 1 °C, 82 ± 5 % de humedad) con alimentación e hidratación adecuada. Las ratas utilizadas fueron de la cepa Holtzman con un peso de entre 200 a 250gr, con una edad de 2 meses y medio, sexo hembras. (ANEXO 02)

3.5 Consideraciones éticas

La presente investigación se trabajó respetando en todo momento las normas éticas, esto ameritó el cumplimiento a lo dispuesto en la Ley N°30407 de la “Ley de Protección y Bienestar animal”, protección de animales domésticos y silvestres mantenidos en cautiverio; y las recomendaciones internacionales para el manejo de animales de experimentación. (27)

3.6 Diseño Experimental

Es de experimento puro, porque el investigador pretende evidenciar una relación de causa y efecto entre las variables en condiciones rigurosamente controladas. (28)

3.7 Materiales y métodos

3.7.1 Material biológico

Hojas de *Ilex guayusa* Loes (guayusa).

Ratas albinas hembras

3.7.2 Material básico de laboratorio

Beaker PYREX

Vaso de precipitado

Piseta

Trípode

Placas Petri

Vaso de precipitación de 250ml.

Probetas de 500ml y 1000ml.

3.7.3 Equipos

Rotavapor Buchi N255 209.

Balanza analítica METTLER TOLEDO Laboratory Balance Modelo AL204.

Balanza digital HENKEL Modelo BRD01

3.7.4 Materiales de experimentación

Jaula de diuresis individual

Embudos

Guantes quirúrgicos

Mascarilla

Jeringas volumétricas de 3mL

Pinza

Gradilla

3.7.5 Fármaco

Furosemida 20mg (Lásix).

* Este fármaco aumenta la saluresis, especialmente la eliminación de Na^+ y Cl^- , además la furosemida es considerada un medicamento de seguridad farmacológica, por poseer efecto secundario e interacción farmacológica menor en comparación con otros diuréticos. Por estos motivos, la furosemida se consideró para el presente trabajo de investigación como control positivo.

3.8 Recolección de la planta

La especie fue recolectada en el mes de abril del 2017 en la localidad de La Colmena, Distrito de Namballe, Provincia de San Ignacio, Departamento de Cajamarca. La Certificación de Identificación Taxonómica se obtuvo de parte del Biólogo Colegiado José Campos De La Cruz, encargado del área de Plantas Naturales del Museo de Historia Natural de la UNMSM. (ANEXO 01). (Fig. 5). Para la obtención de las muestras de *Ilex guayusa* Loes se seleccionaron a los árboles y arbustos de *Ilex guayusa* Loes. La recolección de las hojas se llevó a cabo de manera convencional para el retiro de tallos y frutos, a temprana hora del día, sin humedad ni rocío, desechando hojas con manchas y con cortes.

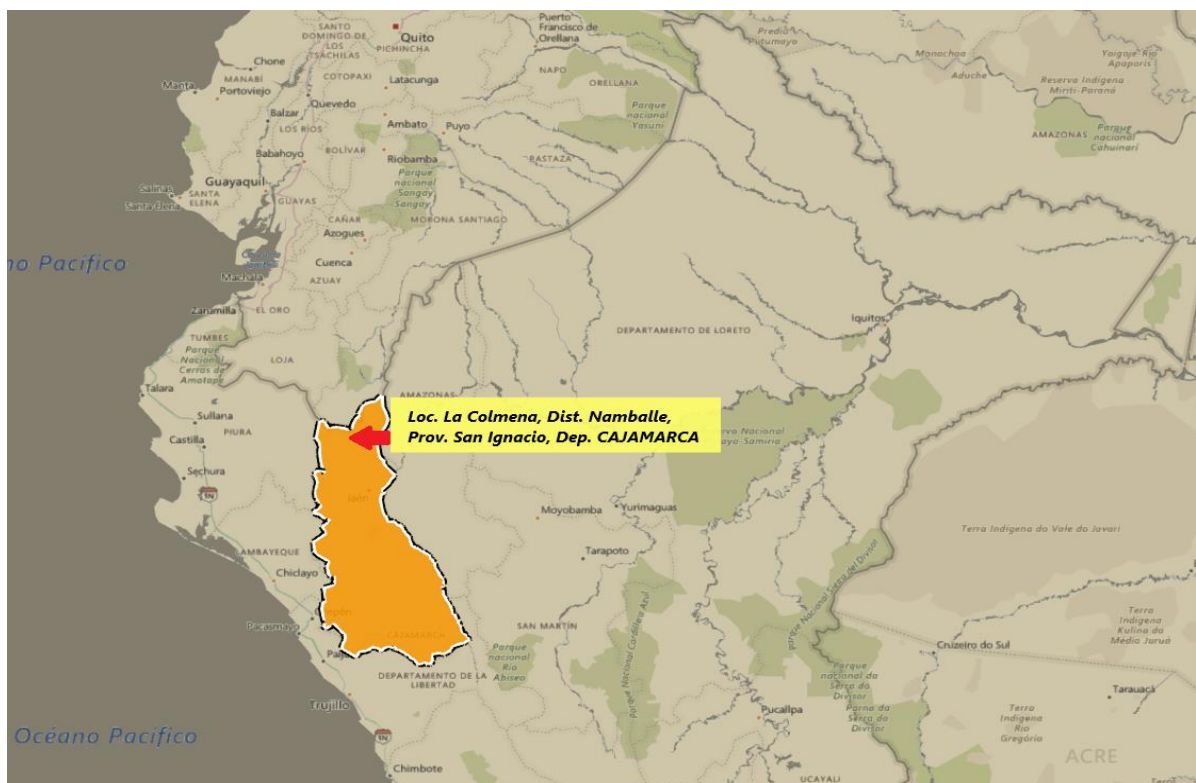


Fig. 5. Localización de la zona donde se realizó la recolección de hojas *Ilex guayusa* Loes

3.9 Secado

3.9.1 Fundamento del secado:

Consiste en eliminar la mayor cantidad posible de agua que tiene la droga vegetal. Esto permite que la droga se estabilice y pueda ser almacenado por periodos largos sin pérdidas significativas. Al disminuir la disponibilidad del agua, se obstruye la

velocidad de descomposición (reacciones enzimáticas). Para tal fin se requiere eliminar el porcentaje de humedad hasta valores menores al 10 %. (29)

3.9.2 Proceso de secado:

La especie botánica colectada luego de ser transportada a Lima (Laboratorio del Departamento de Farmacología, Bromatología y Toxicología de la FFyB - UNMSM) fue seleccionada, eliminando las hojas incompletas y aquellas que se encuentren en proceso de descomposición. Las hojas seleccionadas fueron limpiadas para eliminar insectos y suciedad. Posteriormente 200 g de hojas frescas se secaron a la sombra, en un ambiente cerrado sin luz natural que pueda incidir de manera directa bajo condiciones ambientales. Esta técnica se utilizó, debido a que posiblemente las hojas de *Ilex guayusa* Loes perdían sus aceites esenciales, posible responsable del efecto diurético, mediante exposición directa.

Por 17 días cada 24 horas se realizaron determinaciones de pérdidas de peso por triplicado hasta obtener una masa constante a temperatura ambiente. Es preciso manifestar que se realizó el proceso de secado, debido a que presenta algunas ventajas como: Eliminación de procesos enzimáticos, dilatación o prolongación de la vida útil. Se calculará la pérdida de peso del material fresco de las hojas de *Ilex guayusa* Loes de manera diaria y se tomará en cuenta el porcentaje en peso de agua para finalmente calcular la relación (W seco de hoja/ W H₂O).

3.10 Análisis Fitoquímico

El análisis fitoquímico realizado en los extractos de las hojas de *Ilex guayusa* fue el tamizaje fitoquímico considerando los parámetros de calidad de *Ilex guayusa*. Para realizar el análisis fitoquímico preliminar se utilizó la metodología corrientemente utilizada en el Departamento de Fisicoquímica del Laboratorio de Producción (CENPROFARMA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM para tal propósito, las cuales fueron sometidas a las extracciones con solventes polares: etanol y agua destilada.

3.11 Obtención del extracto acuoso

Para la obtención del extracto acuoso, se tomaron 90 g de las hojas trituradas y/o molidas. Posteriormente se llevó a decocción con agua hirviendo por 5 minutos, luego se mantuvo la muestra en reposo en un recipiente herméticamente cerrado completando a c.s.p 1L con agua destilada, para la maceración por 2 días. Se realizó esta metodología de trabajo de investigación, pues esto simularía el método de preparación tradicional para la obtención de la infusión o té utilizada por la población indígena. Una parte del extracto se utilizará para los ensayos Fitoquímicos.

3.11.1 Determinación del porcentaje de rendimiento (extracto acuoso)

$$\% \text{ EEP} = \frac{\text{Pf} \times 100}{\text{Pi}}$$

➔

$$\% \text{ EEP(EA)} = \frac{11,79}{90\text{g}} \times 100$$

Donde: %EEP=% de rendimiento
Pf=Peso final
Pi=Peso inicial

$$\% \text{ EEP(EA)} = 13.1\%$$



Fig. 6. Ensayos realizados al extracto acuoso de hojas de *Ilex guayusa* Loes

3.12 Obtención del extracto etanólico

Para la obtención del extracto etanólico, se seleccionó el solvente etanol; para ello se tomó en cuenta aspectos de bioseguridad. El alcohol etílico, permitió obtener un extracto conteniendo un alto rendimiento. Por tal motivo, para la obtención del extracto seco etanólico se realizaron procesos de maceración y posterior concentración por evaporación para la obtención de dicho extracto. Se eligió este método de extracción, debido a que el alcohol etílico lisa la pared celular y expelle el aire contenido en el citoplasma, liberando los metabolitos responsables del efecto diurético. Así, las moléculas extraídas de la planta se encuentran libres en la solución para su posterior utilización. Se tomaron 90g de material seco y triturado para ser macerado con etanol en un frasco ámbar para que las hojas de *Ilex guayusa* Loes libere la mayor cantidad de metabolitos en la solución etanólica con la fundamentación descrita en el primer párrafo.

Para ello el solvente etanólico se renovó de modo continuo cada 24 horas por 5 días consecutivos, bajo el método de filtración con algodón se trató de obtener la mayor cantidad de metabolitos en nuestra extracción final. Luego se procedió a evaporar el disolvente. La eliminación del solvente se realizó a presión reducida en un evaporador rotativo llevado a cabo en el Laboratorio de Fisicoquímica (CENPROFARMA). El extracto recogido del evaporador rotativo se mantuvo en placas Petri, a partir del cual se obtendrá los extractos a diferentes concentraciones listos para la administración en los grupos de tratamientos con etanol. Una parte del Extracto se utilizará para los ensayos fitoquímicos.

3.11.1 Determinación del porcentaje de rendimiento (extracto etanólico)

$$\% \text{ EEP} = \frac{\text{Pf} \times 100}{\text{Pi}}$$

➔

$$\% \text{ EEP(EA)} = \frac{10.26}{90\text{g}} \times 100$$

Donde: %EEP=% de rendimiento

Pf=Peso final

Pi=Peso inicial

$$\% \text{ EEP(EA)} = 11.4\%$$

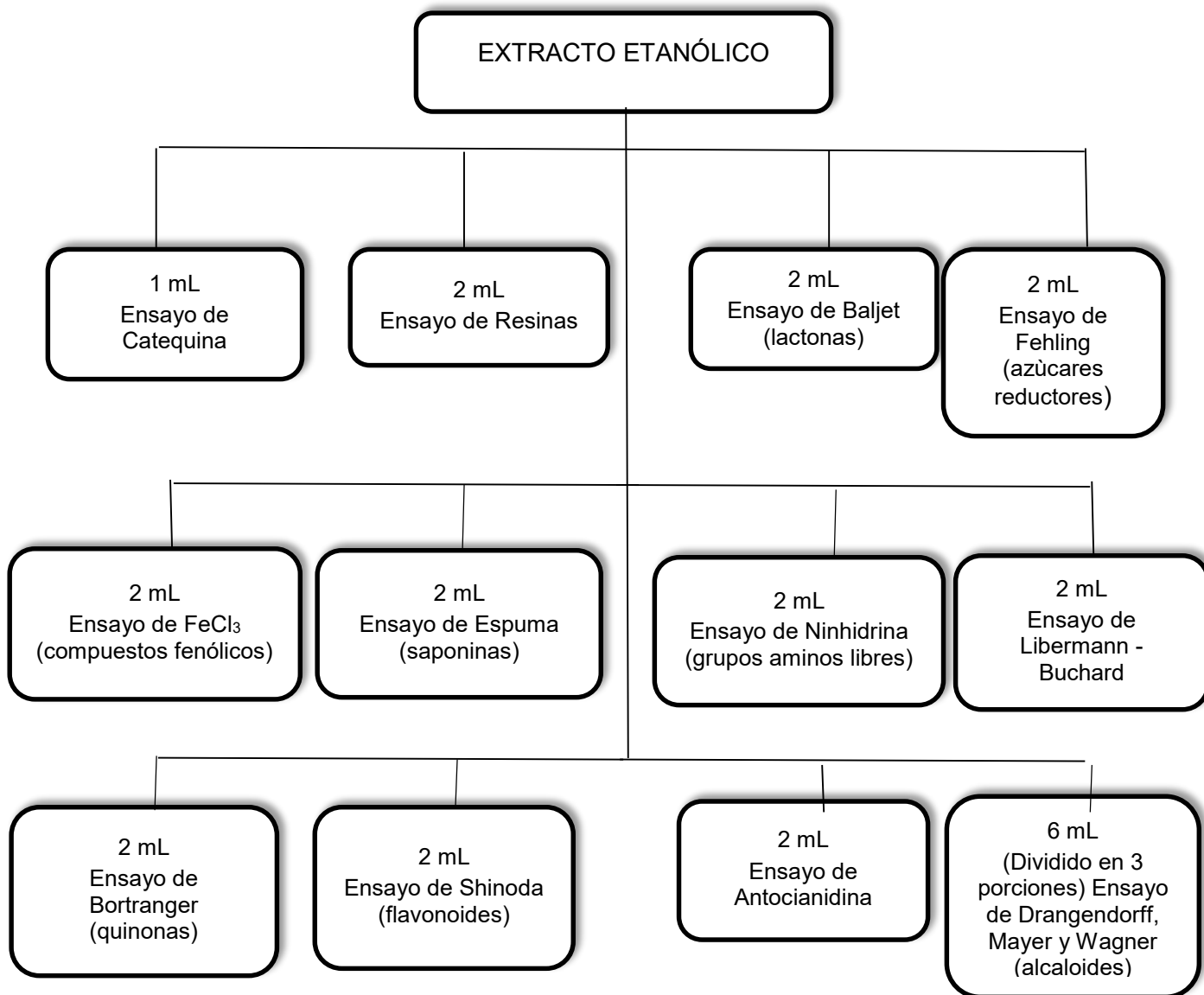


Fig. 7. Ensayos realizados al extracto etanólico de hojas de *Ilex guayusa* Loes

3.13. Preparación de las concentraciones de extractos

Luego de la obtención del extracto seco. Se pasó a preparar las concentraciones de cada grupo de extractos acuoso y etanólico utilizando como vehículo el suero fisiológico de cloruro de sodio al 0,9%.

3.13.1. Cálculo de Dosis

De acuerdo a investigaciones realizadas a plantas con aparente propiedad de efectividad diurética, y de acuerdo a trabajos de investigación, se determinó la cantidad de furosemida a trabajar de 20 mg/kg (9,32), el control negativo con

solución salina de cloruro de sodio 0,9 % (9,32); y la dosis para ambos tipos de extractos a partir de la solución madre como se detalla a continuación:

Tabla 1. Concentraciones de extractos a preparar

GRUPO DE TRATAMIENTO	
Control negativo - NaCl (0,09%)	
Extracto Acuoso (EA)	50 mg/ Kg
	100 mg/ Kg
	200 mg/ Kg
	400 mg/ Kg
	800 mg/ Kg
Control positivo - furosemida (20mg/Kg)	
Extracto Etanólico (EE)	50 mg/ Kg
	100 mg/ Kg
	200 mg/ Kg
	400 mg/ Kg
	800 mg/ Kg

Se trabajó con este rango de dosis de extractos con la finalidad de poder determinar la dosis adecuada con efectividad diurética. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas y se midieron los volúmenes de orina excretados a la 1h, 2h, 4 h y 6h. Se procede a determinar la dosis a administrar a cada grupo de tratamiento del experimento:

Grupo 1: Control negativo (NaCl 0,9 %)

1 mL 100 g (peso de rata)

Tabla 2. Cantidad de suero fisiológico (NaCl 0,9 %)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Volumen de suero NaCl 0,9% administrado (mL)
1	233	2,33
2	241	2,41
3	244	2,44
4	211	2,11
5	246	2,46
6	232	2,32

Grupo 2: Control positivo (20mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

20 mg 1 kg (peso de rata)

20 mg 1 000 g (peso de rata)

Cantidad y volumen total de furosemida:

28,56 mg (furosemida) 12 mL

Tabla 3. Dosis de furosemida (20 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Furosemida (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de furosemida administrado (mL)
1	235	4,7	2,35	1,97
2	249	4,98	2,49	2,09
3	243	4,86	2,43	2,04
4	240	4,8	2,40	2,01
5	242	4,84	2,42	2,03
6	219	4,38	2,19	1,84
	Total	28,56 mg		

3.13.2 Cálculo del volumen de administración de los extractos

Para poder calcular la cantidad de volumen a administrar del extracto de la planta *Ilex guayusa* Loes a cada rata, se utilizó la cantidad total del extracto y se determinó que aproximadamente a cada rata le corresponde un volumen aproximado de 2 mL; siendo un total de 12 mL en cada grupo; sin embargo, para prever una pérdida de volumen por cada administración, se aumentó en 50 % las dosis obteniendo un total de 18 mL de volumen de cada extracto.

Grupo 3: Dosis de extracto acuoso (50 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

50 mg1 kg (peso de rata)

50 mg1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

67,3 mg (extracto acuoso)12 mL

Tabla 4. Cantidad de extracto acuoso (50 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto acuoso (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	224	11,2	2,24	1,99
2	232	11,6	2,32	2,06
3	227	11,35	2,27	2,02
4	234	11,7	2,34	2,08
5	213	10,65	2,13	1,89
6	216	10,8	2,16	1,92
	Total	67,3 mg		

Grupo 4: Dosis de extracto acuoso (100 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

100 mg 1 kg (peso de rata)

100 mg 1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

136,9 mg (extracto acuoso) 12 mL

Tabla 5. Cantidad de extracto acuoso (100 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto acuoso (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	217	21,7	2,17	1,90
2	234	23,4	2,34	2,05
3	225	22,5	2,25	1,97
4	230	23,0	2,30	2,01
5	226	22,6	2,26	1,98
6	237	23,7	2,37	2,07
	Total	136,9 mg		

Grupo 5: Dosis de extracto acuoso (200 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

200 mg 1 kg (peso de rata)

200 mg 1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

268,8 mg (extracto acuoso) 12 mL

Tabla 6. Cantidad de extracto acuoso (200 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto acuoso (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	220	44,0	2,20	1,96
2	218	43,6	2,18	1,94
3	240	48,0	2,40	2,14
4	215	43,0	2,15	1,91
5	217	43,4	2,17	1,93
6	234	46,8	2,34	2,08
	Total	268,8 mg		

Grupo 6: Dosis de extracto acuoso (400 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

400 mg 1 kg (peso de rata)

400 mg 1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

570,0 mg (extracto acuoso) 12 mL

Tabla 7. Cantidad de extracto acuoso (400 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto acuoso (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	243	97,2	2,43	2,05
2	244	97,6	2,44	2,05
3	247	98,8	2,47	2,08
4	246	98,4	2,46	2,07
5	208	83,2	2,08	1,75
6	237	94,8	2,37	1,99
	Total	570,0 mg		

Grupo 7: Dosis de extracto acuoso (800 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

800 mg 1 kg (peso de rata)

800 mg 1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

723,5 mg (extracto acuoso) 12 mL

Tabla 8. Cantidad de extracto acuoso (800 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto acuoso (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	246	123	2,46	2,04
2	244	122	2,44	2,02
3	236	118	2,36	1,95
4	248	124	2,48	2,05
5	230	115	2,30	1,90
6	243	121,5	2,43	2,01
	Total	723,5 mg		

Grupo 8: Dosis de extracto etanólico (50 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

50 mg 1 kg (peso de rata)

50 mg 1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

68,10 mg (extracto etanólico) 12 mL

Tabla 9. Cantidad de extracto etanólico (50 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto etanólico (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	232	11,6	2,32	2,04
2	227	11,35	2,27	2,00
3	234	11,7	2,34	2,06
4	227	11,35	2,27	2,00
5	218	10,9	2,18	1,92
6	224	11,2	2,24	1,97
	Total	68,10 mg		

Grupo 9: Dosis de extracto etanólico (100 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

100 mg 1 kg (peso de rata)

100 mg 1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

139,7 mg (extracto etanólico) 12 mL

Tabla 10. Cantidad de extracto etanólico (100 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto etanólico (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	223	22,3	2,23	2,05
2	236	23,6	2,36	2,05
3	232	23,2	2,32	2,08
4	235	23,5	2,35	2,07
5	242	24,2	2,42	1,75
6	229	22,9	2,29	1,99
	Total	139,7 mg		

Grupo 10: Dosis de extracto etanólico (200 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

200 mg 1 kg (peso de rata)

200 mg 1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

266,4 mg (extracto etanólico) 12 mL

Tabla 11. Cantidad de extracto etanólico (200 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto etanólico (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	221	44,2	2,21	1,99
2	216	43,2	2,16	1,94
3	243	48,6	2,43	2,18
4	218	43,6	2,18	1,96
5	205	41,0	2,05	1,84
6	229	45,8	2,29	2,06
	Total	266,4 mg		

Grupo 11: Dosis de extracto etanólico (400 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

400 mg 1 kg (peso de rata)

400 mg 1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

578,4 mg (extracto etanólico) 12 mL

Tabla 12. Cantidad de extracto etanólico (400 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto etanólico (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	247	98,8	2,47	2,04
2	237	94,8	2,37	1,96
3	226	90,4	2,26	1,87
4	246	98,4	2,46	2,04
5	244	97,6	2,44	2,02
6	246	98,4	2,46	2,04
	Total	578,4 mg		

Grupo 12: Dosis de extracto etanólico (800 mg/kg)

Se determinó la cantidad del extracto mediante la regla de tres:

800 mg.....1 kg (peso de rata)

800 mg.....1 000 g (peso de rata)

Cantidad de extracto y volumen total por grupo de tratamiento:

1116,8 mg (extracto acuoso)12 mL

Tabla 13. Cantidad de extracto etanólico (800 mg/kg)

	Peso de <i>Rattus norvegicus</i> (g)	Cantidad de Extracto acuoso (mg)	Volumen de suero NaCl 0,9 % administrado (mL)	Volumen de extracto administrado (mL)
1	248	198,4	2,48	2,13
2	230	184,0	2,30	1,97
3	227	181,6	2,27	1,95
4	236	188,8	2,36	2,02
5	245	196,0	2,45	2,10
6	210	168,0	2,10	1,80
	Total	1116,8 mg		

3.14 Determinación del efecto diurético

Para su demostración se utilizó el método de Naik et al modificado. El cual consiste en hidratar con solución salina de cloruro de sodio al 0,9% a todas las ratas albinas hembras de la cepa Holtzman en cada grupo de tratamiento, a diferentes dosis según peso, por vía oral. Luego de la hidratación se pasa a eliminar el líquido en exceso en el experimento con la administración de la furosemida y extractos acuoso y etanólico a los animales en estudio.

Procedimiento

- Se utilizaron 72 ratas albinas hembras con un peso promedio de 200 g – 250 g de peso, se dejó en ayunas 10 a 12 horas antes de realizar el experimento, sin privarlas de agua.
- Las ratas albinas fueron convenientemente marcadas, pesadas y distribuidas aleatoriamente en 12 grupos de seis animales cada grupo.
- Posteriormente fueron hidratados con solución salina fisiológica de cloruro de sodio al 0,9% por vía oral mediante una sonda, luego fueron colocados en una jaula para medir la diuresis.

- Luego de 20 minutos de la hidratación a cada grupo de tratamiento se le administró el fármaco y extractos acuoso y etanólico a la dosis a evaluar; excepto el grupo de tratamiento con el control negativo con suero cloruro de sodio al 0,9%.

Los animales fueron puestos en jaulas de diuresis, el cual sirvió para recolectar la orina a la primera hora hasta un período de seis horas. Posteriormente se midieron la orina final de cada rata de cada grupo de tratamiento. Con ello se observó aproximadamente el volumen eliminado, para posteriormente hacer las comparaciones de efecto diurético tanto con el estándar (furosemida) como con el blanco (cloruro de sodio al 0,9%).



Fig. 8. Fotografías de acondicionamiento y procedimiento de experimento en ratas albinas hembras de la cepa Holtzman

Tabla 14. Cantidad de extracto administrado por grupo de tratamiento

GRUPO DE TRATAMIENTO		CANTIDAD DE EXTRACTO ADMINISTRADO (mg)
Extracto Acuoso (EA)	50 mg/ kg	67,3
	100 mg/ kg	136,9
	200 mg/ kg	268,8
	400 mg/ kg	570,0
	800 mg/ kg	723,5
Extracto Etanólico (EE)	50 mg/ kg	68,10
	100 mg/ kg	139,7
	200 mg/ kg	266,4
	400 mg/ kg	578,4
	800 mg/ kg	1116,8

3.15 Porcentaje de diuresis en relación al blanco

La cantidad de orina por grupo de tratamiento con los extractos (acuoso y etanólico) en relación a la orina promedio del blanco con cloruro de sodio, se calculó con la siguiente fórmula:

Donde:

$$\% \text{ de diuresis en relación al blanco} = \frac{X - \text{Control blanco}}{\text{Control blanco}} \times 100$$

- X = Volumen de orina por grupo de tratamiento Tx
- Control blanco = Volumen de orina del blanco (NaCl 0,9%)

3.16 Acción diurética de los grupos de tratamiento

Para poder determinar la acción diurética, se tuvo que tener la excreción de orina en todos los grupos de tratamientos y compararlos con la furosemida con la siguiente fórmula:

$$\text{Acción diurética} = \frac{\text{Excreción urinaria del grupo tratado}}{\text{Excreción urinaria del grupo control}} \times 100$$

Posteriormente se procedió a realizar un análisis estadístico para comprobar la existencia de una diferencia entre los diferentes tratamientos, comparando estos con el control positivo (furosemida) con actividad comprobada.

3.17 Análisis estadístico

Los volúmenes de orina fueron expresados como \pm la media, porcentaje de diuresis y desviación estándar de cada grupo de tratamiento, donde se representaron en tablas y en forma de barras. El porcentaje de Excreción Urinaria (EU) sirvió para calcular el porcentaje de actividad diurética (AD) para cada grupo de tratamiento; asimismo, los datos fueron sometidos al análisis de varianza, (ANOVA) de un factor. Además, se empleó para ambos extractos, las pruebas de Post Hot Tukey, el cual nos permitió hacer comparaciones múltiples de diferencias de medias y si son estadísticamente significativas, y la prueba Tukey, el cual nos permitió observar las medias para los grupos de tratamiento en los subconjuntos homogéneos a partir del promedio de volumen de orina. Los datos fueron analizados, procesados y graficados en el capítulo IV: Resultados.

IV: RESULTADOS

4.1 Análisis de materia prima (Hojas *Ilex guayusa* Loes)

Para garantizar que las hojas de guayusa utilizadas, fueron tratadas correctamente hasta la obtención de los extractos etanólico y acuoso; se tienen los siguientes resultados de análisis:

4.1.1 Análisis de secado (Hojas *Ilex guayusa* Loes)

Este análisis se realizó mediante el método de secado al ambiente. Se alcanzó un peso constante a los 17 días del proceso de secado al ambiente (libre de rayos solares, a temperatura ambiente), del 02 de mayo del 2017 al 19 de mayo del 2017, la temperatura fue determinada bajo la ayuda de un termómetro digital. En la tabla 15 se muestra el peso promedio obtenido de las hojas, además de los porcentajes de pérdida de peso. De los 17 días después de medir los pesos, se observó que, a partir del 15to día, hasta el 17mo día presentan un peso promedio igual (196,81 g, 196,72 g y 196,05 g). Como resultado, las hojas de *Ilex guayusa* Loes presentaron una pérdida de peso del material fresco de 47,78 % respecto al peso inicial de la hoja. El porcentaje de peso en agua que se perdió fue de 52,21%.



Fig. 9. Proceso de secado de hojas de *Ilex guayusa* Loes

De acuerdo al porcentaje en peso seco de hojas secas de *Ilex guayusa* Loes y el porcentaje en peso de agua, se calculó la relación:

$$\frac{\% \text{ W seco de hoja}}{\% \text{ W H}_2\text{O}} \rightarrow \frac{47,78\%}{52,21\%} = 0,91$$

Tabla 15. Pérdida de peso en el método de secado al ambiente

Día	Peso Inicial (g)	Temperatura ambiente	Pérdida de peso por día (g)	% Pérdida por día (%)
1er. día	410,25	26 °C	79,90	19,47
2do. día	330,35	28 °C	48,20	14,59
3er. día	282,15	29 °C	36,88	13,07
4to. día	245,27	31 °C	9,07	3,69
5to. día	236,12	27 °C	0,96	0,40
6to. día	235,16	29 °C	6,11	2,59
7mo. día	229,05	28 °C	6,88	3,00
8vo. día	222,17	26 °C	3,98	1,79
9no. día	218,19	28 °C	0,91	0,41
10mo. día	217,28	30 °C	8,05	3,70
11er. día	208,78	27 °C	7,62	3,64
12do. día	201,16	28 °C	3,12	1,55
13er. día	198,04	29 °C	0,89	0,44
14to. día	197,15	27 °C	0,34	0,17
15to. día	196,81	28 °C	0,09	0,04
16to. día	196,72	29 °C	0,67	0,34
17mo. día	196,05	27 °C	-	-

4.1.2 Análisis Fitoquímico (hojas *Ilex guayusa* Loes)

Los resultados del tamizaje fitoquímico, evidencian algunos grupos funcionales característicos de los tipos de metabolitos que se pretenden identificar. Por esta razón el tamizaje fitoquímico no es evidencia absoluta para determinar la presencia o ausencia de alguno.

El tamizaje fitoquímico realizado a los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Ilex guayusa* evidenció la presencia de alcaloides, flavonoides, catequinas, taninos, compuestos reductores, saponinas y quinonas siendo los alcaloides, flavonoides,

taninos y saponinas los metabolitos con mayor presencia según sus reacciones de prueba del extracto (ANEXO 03).

Tabla 16. Análisis fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Ilex guayusa* Loes

Metabolito	Método	Extracto Etanólico (EE)	Extracto Acuoso (EA)
Alcaloides	Dragendorff	+	+
Flavonoides	Shinoda	-	+
	Antocianidinas	-	-
	Catequinas	+	+
Compuestos fenólicos	Cloruro Férrico	+	+
Azúcar reductores	Fehling	+	+
Mucílagos	Mucílagos		-
Saponinas	Espuma	+	+
Triterpenos Esteroides	Lieberman – Buchard	+	+
Grupos aminos libres	Ninhidrina	-	-
Quinonas	Borntranger	+	-
Lactonas	Baljet	-	-
Resinas	Resinas	+	+

Leyenda: (+) PRESENCIA, (-) AUSENCIA

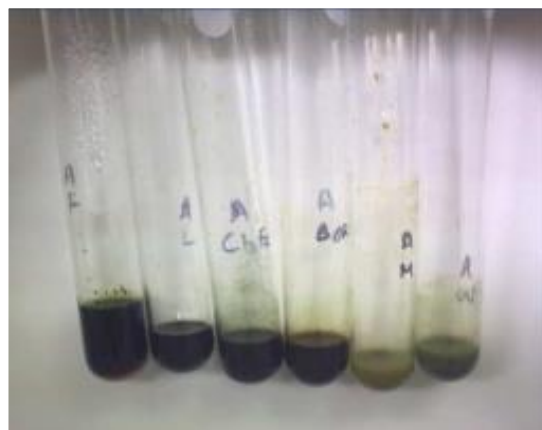
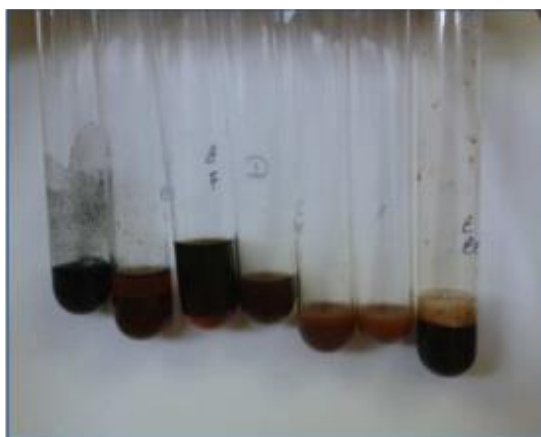


Fig. 10. Fotografías de resultados de marcha fitoquímica en extracto acuoso (izquierda) y extracto etanólico (derecha)

4.2. Análisis de resultados de extractos:

En el presente análisis de resultados de extractos, el experimento estuvo compuesto por un total de 72 ratas a los cuales se aplicó un total de 4 tratamientos: control negativo (NaCl 0,09%), extracto acuoso (con las 5 dosis distintas expresados en mg/kg), control positivo (Furosemida 20mg/kg) y extracto etanólico (con las 5 dosis distintas expresados en mg/kg). Así, con el fin de evaluar el comportamiento del nivel de la efectividad diurética medida a partir del volumen total de orina por cada grupo de Tratamiento (tabla 29) donde se verifica el resumen de las medias de volúmenes de orina total por grupo de tratamiento. Se presentan también los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos realizados en grupos: grupo control positivo para el cual se utilizó furosemida en dosis de 20 mg/kg de peso, los extractos de las plantas estudiadas en las 5 dosis distintas y por último el grupo control negativo (NaCl 0,09%) (Fig. 11).

Tabla 17. Volumen de orina de control negativo (NaCl 0,9 %)

Nº	PESO DE RATA (gramos)	VOL. SUERO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	233	2,33	1	1,1	2,6	2,63
			2	1,5		
			4	2,0		
			6	2,6		
2	241	2,41	1	1,5	2,4	
			2	1,8		
			4	2,0		
			6	2,4		
3	244	2,44	1	1,8	2,9	
			2	2,1		
			4	2,2		
			6	2,9		
4	211	2,11	1	2,1	2,7	
			2	2,3		
			4	2,3		
			6	2,7		
5	246	2,46	1	2,2	2,5	
			2	2,4		
			4	2,5		
			6	2,5		
6	232	2,32	1	1,7	2,7	
			2	1,9		
			4	2,3		
			6	2,7		

Tabla 18. Volumen de orina de extracto acuoso (50 mg/kg)

Nº	PESO DE RATA (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	224	1,99	1	2,0	2,8	3,31
			2	2,5		
			4	2,6		
			6	2,8		
2	232	2,06	1	2,7	3,5	
			2	3,3		
			4	3,5		
			6	3,5		
3	227	2,02	1	3,3	4,2	
			2	4,1		
			4	4,2		
			6	4,2		
4	234	2,08	1	2,7	3,5	
			2	3,3		
			4	3,3		
			6	3,5		
5	213	1,89	1	1,9	2,5	
			2	2,4		
			4	2,5		
			6	2,5		
6	216	1,92	1	2,1	3,4	
			2	2,9		
			4	3,3		
			6	3,4		

Tabla 19. Volumen de orina de extracto acuoso (100 mg/kg)

Nº	PESO DE RATA (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	217	1,90	1	4,3	5,2	5,36
			2	4,9		
			4	4,9		
			6	5,2		
2	234	2,05	1	4,5	5,3	
			2	4,8		
			4	5,0		
			6	5,3		
3	225	2,25	1	4,5	5,5	
			2	5,1		
			4	5,3		
			6	5,5		
4	230	2,30	1	3,7	4,9	
			2	4,3		
			4	4,4		
			6	4,9		
5	226	2,26	1	4,6	5,6	
			2	5,9		
			4	5,5		
			6	5,6		
6	237	2,37	1	4,4	5,7	
			2	4,9		
			4	5,3		
			6	5,7		

Tabla 20. Volumen de orina de extracto acuoso (200 mg/kg)

Nº	PESO (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	220	1,96	1	4,8	6,0	6,70
			2	5,5		
			4	5,9		
			6	6,0		
2	218	1,94	1	5,5	6,2	
			2	6,2		
			4	6,2		
			6	6,2		
3	240	2,14	1	6,1	7,0	
			2	6,9		
			4	6,9		
			6	7,0		
4	215	1,91	1	5,9	6,5	
			2	6,3		
			4	6,5		
			6	6,5		
5	217	1,93	1	5,8	6,7	
			2	6,6		
			4	6,7		
			6	6,7		
6	234	2,08	1	6,7	7,8	
			2	7,4		
			4	7,4		
			6	7,8		

Tabla 21. Volumen de orina de extracto acuoso (400 mg/kg)

Nº	PESO (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	243	2,05	1	7,2	10,6	10,43
			2	9,8		
			4	10,3		
			6	10,6		
2	244	2,05	1	8,8	10,1	
			2	9,5		
			4	9,9		
			6	10,1		
3	247	2,08	1	7,7	10,7	
			2	9,2		
			4	10,6		
			6	10,7		
4	246	2,07	1	7,9	11,1	
			2	9,6		
			4	10,9		
			6	11,1		
5	208	1,75	1	7,6	9,1	
			2	8,7		
			4	8,9		
			6	9,1		
6	237	1,99	1	8,9	11,0	
			2	10,4		
			4	10,9		
			6	11,0		

Tabla 22. Volumen de orina de extracto acuoso (800 mg/kg)

Nº	PESO (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	246	2,04	1	7,9	9,0	8,31
			2	8,4		
			4	8,6		
			6	9,0		
2	243	2,01	1	7,2	8,4	
			2	7,8		
			4	7,9		
			6	8,4		
3	248	2,05	1	8,2	9,3	
			2	9,1		
			4	9,3		
			6	9,3		
4	230	1,90	1	6,1	7,1	
			2	6,8		
			4	6,9		
			6	7,1		
5	236	1,95	1	6,8	7,5	
			2	7,4		
			4	7,4		
			6	7,5		
6	244	2,02	1	7,8	8,6	
			2	8,2		
			4	8,4		
			6	8,6		

Tabla 23. Volumen de orina de control positivo – furosemida (20 mg/kg)

Nº	PESO (gramos)	VOL. FUROSEMIDA ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	235	1,97	1	8,1	9,8	10,75
			2	9,0		
			4	9,4		
			6	9,8		
2	249	2,09	1	11,5	12,0	
			2	11,8		
			4	12,0		
			6	12,0		
3	243	2,04	1	10,8	11,6	
			2	11,1		
			4	11,2		
			6	11,6		
4	240	2,01	1	10,7	11,0	
			2	10,9		
			4	11,0		
			6	11,0		
5	242	2,03	1	9,8	11,4	
			2	10,4		
			4	10,9		
			6	11,4		
6	219	1,84	1	7,7	8,7	
			2	7,8		
			4	8,3		
			6	8,7		

Tabla 24. Volumen de orina de extracto etanólico (50 mg/kg)

Nº	PESO (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	218	1,92	1	1,7	2,0	3,01
			2	1,9		
			4	2,0		
			6	2,0		
2	227	2,0	1	2,5	3,0	
			2	2,8		
			4	3,0		
			6	3,0		
3	234	2,06	1	3,2	3,8	
			2	3,7		
			4	3,8		
			6	3,8		
4	232	2,04	1	3,1	3,6	
			2	3,4		
			4	3,5		
			6	3,6		
5	224	1,97	1	2,1	2,7	
			2	2,6		
			4	2,6		
			6	2,7		
6	227	2,0	1	2,6	3,0	
			2	2,8		
			4	3,0		
			6	3,0		

Tabla 25. Volumen de orina de extracto etanólico (100 mg/kg)

Nº	PESO (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	223	1,91	1	4,9	5,3	5,98
			2	5,0		
			4	5,2		
			6	5,3		
2	236	2,02	1	5,7	6,2	
			2	5,9		
			4	5,9		
			6	6,2		
3	232	1,99	1	5,3	5,9	
			2	5,7		
			4	5,8		
			6	5,9		
4	235	2,01	1	5,5	6,1	
			2	5,8		
			4	6,0		
			6	6,1		
5	242	2,07	1	5,9	6,8	
			2	6,4		
			4	6,6		
			6	6,8		
6	229	1,96	1	5,1	5,6	
			2	5,3		
			4	5,6		
			6	5,6		

Tabla 26. Volumen de orina de extracto etanólico (200 mg/kg)

Nº	PESO (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	205	1,84	1	5,6	6,0	6,66
			2	5,8		
			4	5,9		
			6	6,0		
2	216	1,94	1	5,9	6,3	
			2	6,2		
			4	6,3		
			6	6,3		
3	221	1,99	1	6,3	6,7	
			2	6,5		
			4	6,7		
			6	6,7		
4	229	2,06	1	6,7	7,1	
			2	6,9		
			4	7,0		
			6	7,1		
5	218	1,96	1	6,0	6,5	
			2	6,2		
			4	6,5		
			6	6,5		
6	243	2,18	1	6,6	7,4	
			2	7,1		
			4	7,3		
			6	7,4		

Tabla 27. Volumen de orina de extracto etanólico (400 mg/kg)

Nº	PESO (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	247	2,04	1	9,5	10,1	9,73
			2	9,9		
			4	10,0		
			6	10,1		
2	244	2,02	1	9,2	9,8	
			2	9,6		
			4	9,8		
			6	9,8		
3	226	1,87	1	7,8	9,0	
			2	8,5		
			4	8,7		
			6	9,0		
4	246	2,04	1	9,4	10,0	
			2	9,7		
			4	9,9		
			6	10,0		
5	237	1,96	1	8,8	9,5	
			2	9,2		
			4	9,3		
			6	9,5		
6	246	2,04	1	9,1	10,0	
			2	9,6		
			4	9,8		
			6	10,0		

Tabla 28. Volumen de orina de extracto etanólico (800 mg/kg)

Nº	PESO (gramos)	VOL. EXTRACTO ADMINISTRADO (mL)	HORA (H)	VOL. ORINA (mL)	VOL. ORINA ACUMULADA (mL) A LAS 6 HORAS	PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)
1	210	1,80	1	6,1	7,2	9,93
			2	6,8		
			4	7,1		
			6	7,2		
2	248	2,13	1	12,6	13,0	
			2	12,9		
			4	13,0		
			6	13,0		
3	230	1,97	1	8,4	9,6	
			2	9,1		
			4	9,4		
			6	9,6		
4	227	1,95	1	8,8	9,5	
			2	9,3		
			4	9,5		
			6	9,5		
5	245	2,10	1	9,8	10,5	
			2	10,4		
			4	10,4		
			6	10,5		
6	236	2,02	1	9,1	9,8	
			2	9,7		
			4	9,8		
			6	9,8		

Tabla 29. Media de volumen de orina por grupo de tratamiento

Nº	GRUPO DE TRATAMIENTO		PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)	MEDIA VOL. ORINA - GRUPO TRATAMIENTO (mL)
1	Control Negativo - NaCl (0,09%)		2,63	2,63
2	Extracto Acuoso (EA)	50 mg/ kg	3,31	6,82
		100 mg/ kg	5,36	
		200 mg/ kg	6,70	
		400 mg/ kg	10,43	
		800 mg/ kg	8,31	
3	Control Positivo - Furosemida (20mg/Kg)		10,75	10,75
4	Extracto Etanólico (EE)	50 mg/ kg	3,01	7,06
		100 mg/ kg	5,98	
		200 mg/ kg	6,66	
		400 mg/ kg	9,73	
		800 mg/ kg	9,93	

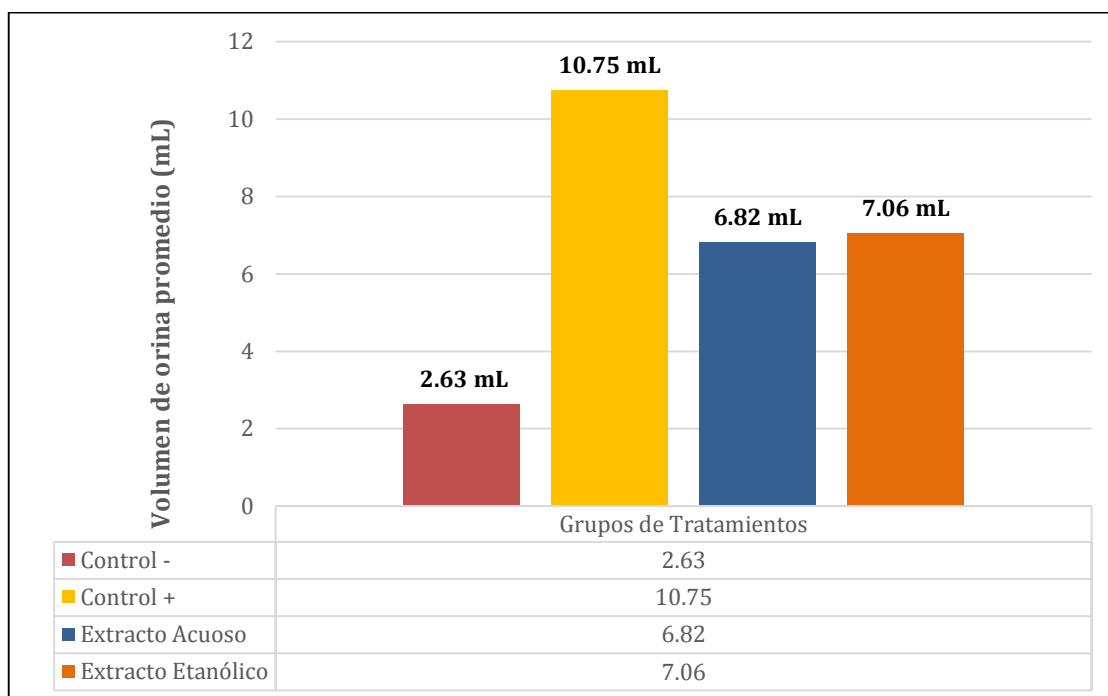


Fig. 11. Promedio de los volúmenes (mL) al final del ensayo de diuresis a diferentes concentraciones de los extractos acuoso y etanólico.

Análisis de resultados:

En la figura 11 se observa que el promedio del volumen del control positivo del fármaco furosemida (10,75 mL) es mayor en comparación a lo obtenido en el grupo de control negativo NaCl 0,9% (2,63 mL) y a la media de volumen total de subgrupos de los tratamientos con extractos acuoso (6,82 mL) y etanólico (7,06 mL) respectivamente.

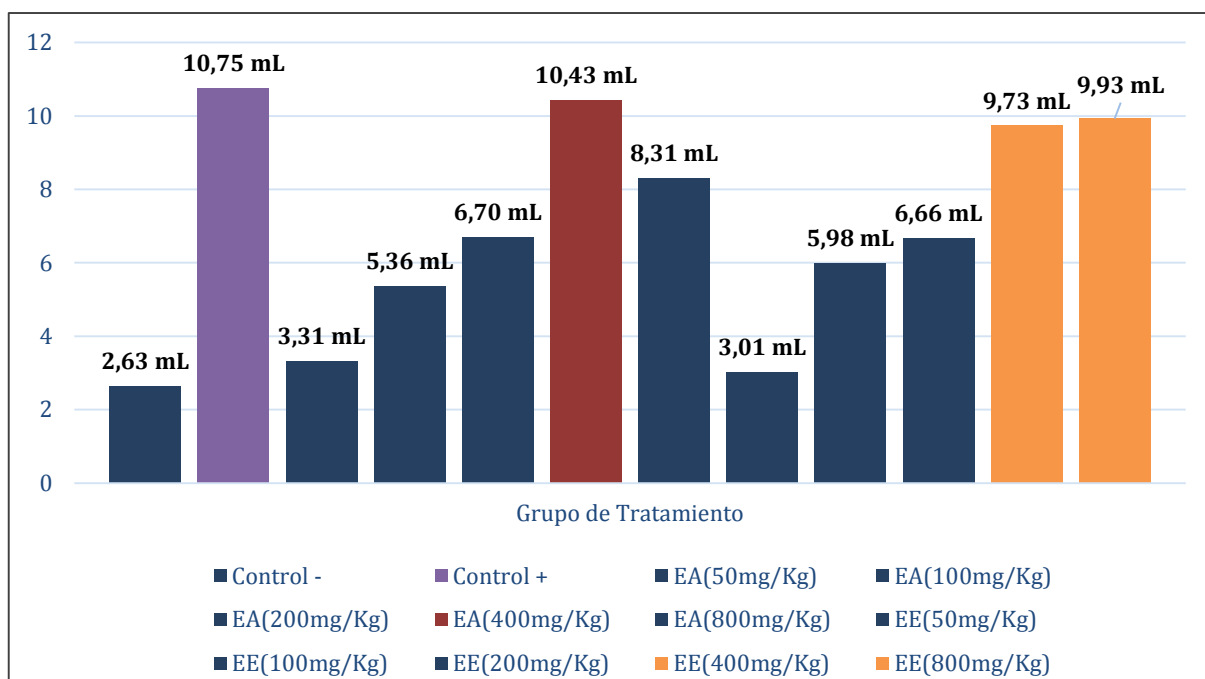


Fig. 12. Media de volumen de orina por grupo de tratamiento - Resumen

Análisis de resultados:

En la figura 12 se observa que el promedio del volumen del control positivo del fármaco (furosemida), es mayor a todos los demás tratamientos incluyendo al blanco con una cantidad igual a 10,75 mL, el volumen de orina promedio del blanco o control negativo es de 2,63 mL, los volúmenes de orina promedios obtenidos para cada uno de los tratamientos con extracto acuoso a diferentes dosis: EA(50 mg/kg)= 3,31 mL, EA (100 mg/kg)= 5,36 mL, EA (200 mg/kg)= 6,70 mL, EA (400 mg/kg)= 10,43 mL y EA (800 mg/kg)= 8,31 mL; y en caso de volumen promedio de orina obtenido con Extracto Etanólico a diferentes dosis: EE (50 mg/kg)= 3,01 mL, EE (100 mg/kg)= 5,98 mL, EA (200 mg/kg)= 6,66 mL, EE (400 mg/kg)= 9,73 mL y EE (800 mg/kg)= 9,93 mL, siendo EA (400 mg/kg) de barra de color rojo oscuro, el grupo que presentó mayor volumen de orina en comparación con los otros tratamientos. Los tratamientos EE (400 mg/kg) y EE (800 mg/kg), ambas barras de color amarillo, poseen un marcado comportamiento de efecto diurético, en comparación con las demás dosis de tratamiento de menor concentración y del grupo con control negativo o blanco.

Tabla 30. Porcentaje de diuresis respecto al blanco (NaCl 0,9%)

GRUPO DE TRATAMIENTO		PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)	% de Diuresis respecto al BLANCO (%)
Extracto Acuoso (EA)	50 mg/ kg	3,31	26
	100 mg/ kg	5,36	104
	200 mg/ kg	6,70	155
	400 mg/ kg	10,43	297
	800 mg/ kg	8,31	216
Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)		10,75	309
Extracto Etanólico (EE)	50 mg/ kg	3,01	14
	100 mg/ kg	5,98	127
	200 mg/ kg	6,66	153
	400 mg/ kg	9,73	270
	800 mg/ kg	9,93	278

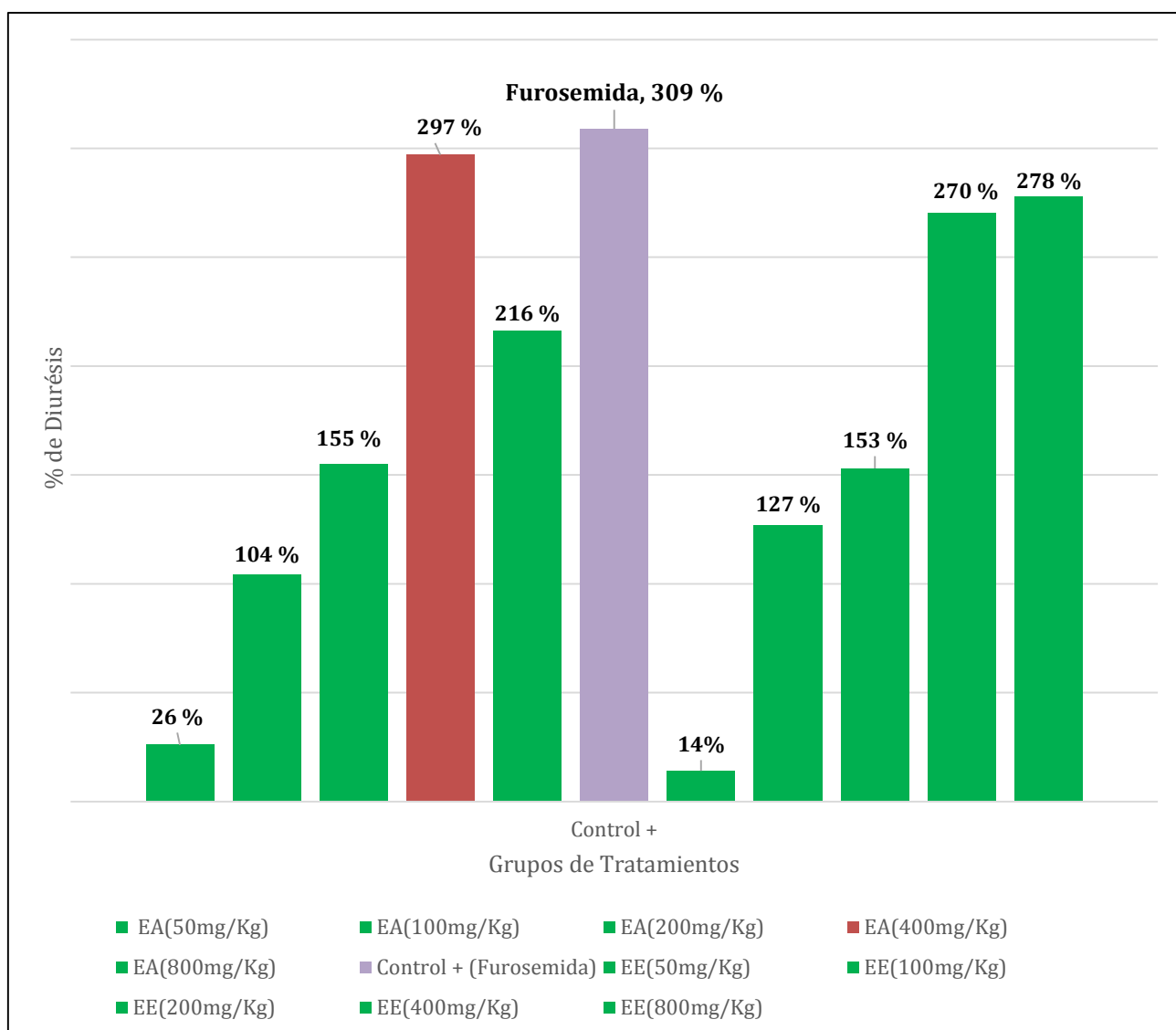


Fig. 13. Porcentaje de diuresis respecto al blanco

Análisis de resultados:

En la figura 13 se muestra el porcentaje de diuresis en relación al blanco, se observó que el grupo de control positivo del fármaco (furosemida), es mayor a todos los tratamientos con 309 %, respecto a lo obtenido en los tratamientos con los extractos, se tiene que el grupo EA (400 mg/kg)= 297 %, el cual presentó un mayor porcentaje de diuresis en comparación con los otros grupos de tratamientos, seguido de los grupos EE (400 mg/kg)= 270 % y EE (800 mg/kg)= 278 %, mayores en comparación con el resto de tratamientos. Se observa que el grupo con un buen efecto diurético en comparación al resto y muy cercano al porcentaje de diuresis del control positivo, fue el grupo EE (400 mg/kg)= 270 %.

Tabla 31. Porcentaje de diuresis respecto al control positivo (furosemina)

GRUPO DE TRATAMIENTO		PROMEDIO VOL. ORINA TOTAL (mL)	% de Diuresis respecto a la FUROSEMIDA (%)
Extracto Acuoso (EA)	50 mg/ kg	3,31	31
	100 mg/ kg	5,36	50
	200 mg/ kg	6,70	63
	400 mg/ kg	10,43	97
	800 mg/ kg	8,31	77
Extracto Etanólico (EE)	50 mg/ kg	3,01	28
	100 mg/ kg	5,98	56
	200 mg/ kg	6,66	62
	400 mg/ kg	9,73	91
	800 mg/ kg	9,93	92

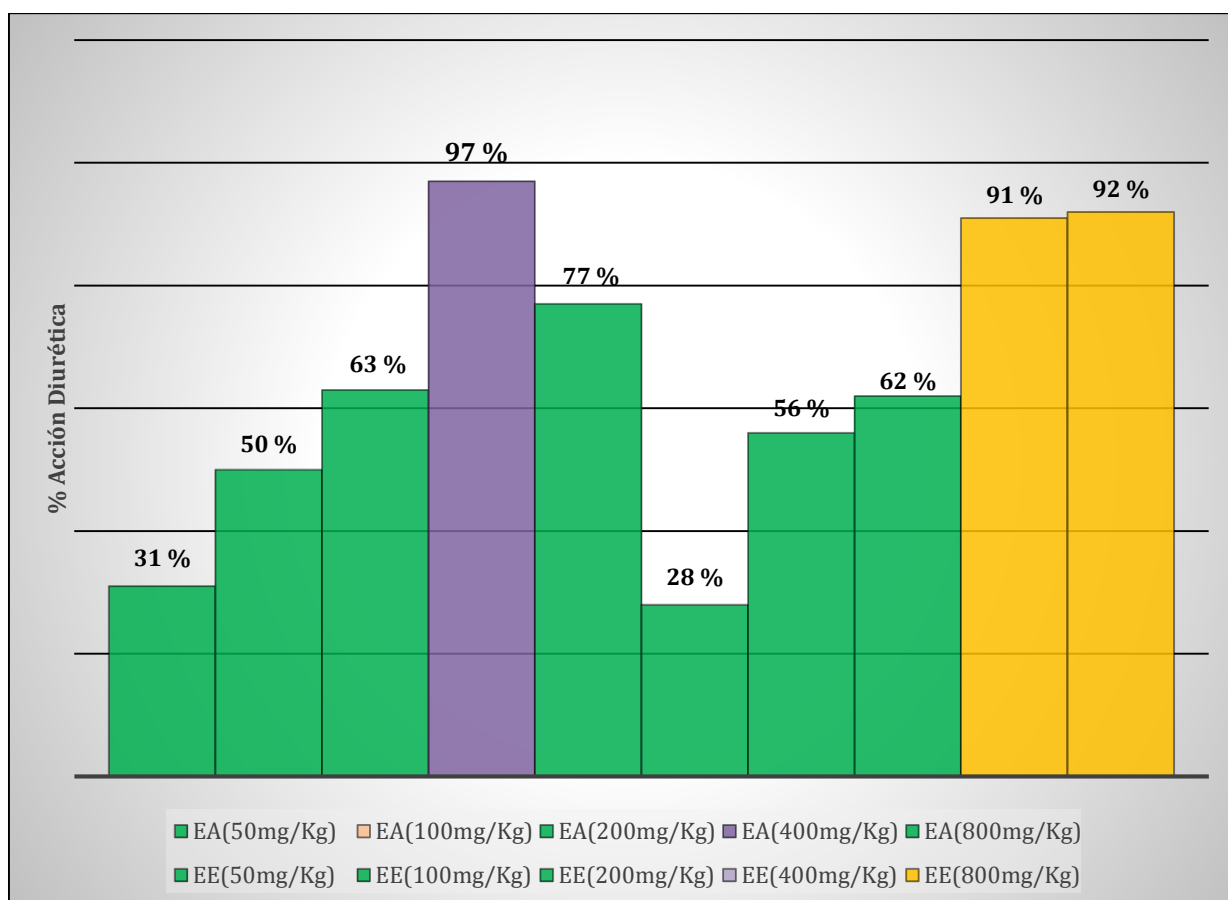


Fig. 14. Porcentaje de diuresis respecto a la furosemina

Análisis de resultados:

En la figura 14 se muestra en porcentaje la acción diurética de los grupos de tratamientos respecto al control positivo (furosemida). De ello el grupo de tratamiento EA (400 mg/kg) = 97 % posee el mayor porcentaje de acción diurética frente a los demás tratamientos seguidamente de los grupos de tratamientos EE (400 mg/kg) = 91 % y EE (400 mg/kg)= 92%.

4.3. Análisis de la actividad diurética

Se evaluó la efectividad diurética en las ratas para cada una de los grupos de tratamientos. La acción diurética fue calculada a partir de la siguiente formula:

$$\text{Acción diurética} = \frac{\text{Excreción urinaria de grupo tratado}}{\text{Excreción urinaria de grupo control}}$$

Medida en la siguiente Escala: Alta: AD > 0,90, Moderada: AD (0,89 – 0,70), Baja: AD (0,69 – 0,50), Nula: AD<0,50.

El efecto diurético se relaciona con el volumen de orina excretado después de 6 horas (mL/kg) por los grupos experimentales: extracto acuoso, furosemida y extracto etanólico con el volumen de orina excretado (mL/kg) por los grupos experimentales controles negativos. Los resultados, se muestran en la Tabla 32, en la cual se observa que el grupo EA (400 mg/kg) = 0.97, EE (400 mg/kg) = 0.90 y EE (800 mg/kg) = 0.92 presentaron una acción diurética (AD) superior a 0,9 lo cual indica que la acción diurética de cada uno de estos grupos de tratamientos aplicados es alta. Como es de esperarse, el tratamiento con Furosemida fue el que mostro una mayor actividad diurética en las ratas.

Tabla 32. Actividad diurética

Tratamiento	Actividad diurética
Control negativo-Suero fisiológico (0,9%)	-
EA 50 mg/kg	0,30
EA 100 mg/kg	0,49
EA 200 mg/kg	0,62
EA 400 mg/kg	0,97
EA 800 mg/kg	0,77
Control positivo - furosemida (20mg/kg)	1,0
EE 50 mg/kg	0,28
EE 100 mg/kg	0,55
EE 200 mg/kg	0,61
EE 400 mg/kg	0,90
EE 800 mg/kg	0,92

4.4 Análisis estadístico - Resultados:

4.4.1 Análisis estadístico: Extracto acuoso vs Extracto etanólico

Tabla 33. Análisis de varianza

Descriptivos								
Promedio de Volumen de Orina								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Volumen de orina de Control negativo (NaCl 0,9 %)	6	2,6333	0,17512	0,07149	2,4496	2,8171	2,40	2,90
Volumen de orina de Extracto acuoso (50 mg/kg)	6	3,3167	0,59805	0,24415	2,6890	3,9443	2,50	4,20
Volumen de orina de Extracto acuoso (100 mg/kg)	6	5,3667	0,29439	0,12019	5,0577	5,6756	4,90	5,70
Volumen de orina de Extracto acuoso (200 mg/kg)	6	6,7000	0,64498	0,26331	6,0231	7,3769	6,00	7,80
Volumen de orina de Extracto acuoso (400 mg/kg)	6	10,4333	0,74207	0,30295	9,6546	11,2121	9,10	11,10
Volumen de orina de Extracto acuoso (800 mg/kg)	6	8,3167	0,85654	0,34968	7,4178	9,2156	7,10	9,30
Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)	6	10,7500	1,25499	0,51235	9,4330	12,0670	8,70	12,00
Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	6	3,0167	0,64627	0,26384	2,3384	3,6949	2,00	3,80
Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	6	5,9833	0,51929	0,21200	5,4384	6,5283	5,30	6,80
Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	6	6,6667	0,51640	0,21082	6,1247	7,2086	6,00	7,40
Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	6	9,7333	0,41793	0,17062	9,2947	10,1719	9,00	10,10
Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	6	9,9333	1,87154	0,76405	7,9693	11,8974	7,20	13,00
Total	72	6,9042	2,94941	0,34759	6,2111	7,5972	2,00	13,00

Los resultados para el análisis de Varianza se describen en la presente tabla 33 de los 12 grupos de tratamiento. En la tabla se puede analizar la desviación estándar y los límites inferior y superior del 95% de intervalo de confianza para la media de volumen de orina. Ello nos permitió determinar el nivel de confianza para las conclusiones. Los niveles mínimo y máximo de orina nos permitió determinar el rango de orina por grupo de tratamiento. Tal es el caso del grupo de tratamiento con

volumen superior al grupo control (furosemida) = 12,00 mL, fue el grupo de tratamiento de extracto etanólico (800mg/kg) = 13,00mL.

4.4.2. Análisis Estadístico del Grupo Control: Extracto acuoso

Tabla 34. Promedio de volúmenes de orina

Descriptivos								
Promedio de Volumen de Orina								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Volumen de orina de Extracto acuoso (50 mg/kg)	6	3,3167	0,59805	0,24415	2,6890	3,9443	2,50	4,20
Volumen de orina de Extracto acuoso (100mg/kg)	6	5,3667	0,29439	0,12019	5,0577	5,6756	4,90	5,70
Volumen de orina de Extracto acuoso (200 mg/kg)	6	6,7000	0,64498	0,26331	6,0231	7,3769	6,00	7,80
Volumen de orina de Extracto acuoso (400 mg/kg)	6	10,433	0,74207	0,30295	9,6546	11,2121	9,10	11,10
Volumen de orina de Extracto acuoso (800 mg/kg)	6	8,3167	0,85654	0,34968	7,4178	9,2156	7,10	9,30
Total	30	6,8267	2,55220	0,46597	5,8737	7,7797	2,50	11,10

- **ANOVA de un Factor**

Tabla 35. ANOVA de un factor en extracto acuoso

Promedio de Volumen de Orina					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	178,175	4	44,544	103,848	0,000
Dentro de grupos	10,723	25	0,429		
Total	188.899	29			

Los resultados para el análisis de la Prueba de ANOVA del Factor de volumen de orina, realizados bajo el programa SPSS, para el grupo control de extracto acuoso, en las dosis de 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg, 400mg/kg y 800mg/kg, determinó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, con un resultado de F (Distribución de Probabilidad Continua) por 103,848 y una significancia de $0,000 < 0,05$, por tanto es necesario realizar la prueba de Tukey.

- Prueba Post Hoc Tukey

Tabla 36. Comparaciones múltiples

Variable dependiente:							
(I) Grupo de tratamiento			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	Volumen de orina de Extracto acuoso (50 mg/kg)	Volumen de orina de Extracto acuoso (100 mg/kg)	-2,05000*	0,37812	0.000	-3,1605	-0,9395
		Volumen de orina de Extracto acuoso (200 mg/kg)	-3,38333*	0,37812	0.000	-4,4938	-2,2728
		Volumen de orina de Extracto acuoso (400 mg/kg)	-7,11667*	0,37812	0.000	-8,2272	-6,0062
		Volumen de orina de Extracto acuoso (800 mg/kg)	-5,00000*	0,37812	0.000	-6,1105	-3,8895
	Volumen de orina de Extracto acuoso (100 mg/kg)	Volumen de orina de Extracto acuoso (50 mg/kg)	2,05000*	0,37812	0.000	0,9395	3,1605
		Volumen de orina de Extracto acuoso (200 mg/kg)	-1,33333*	0,37812	0.013	-2,4438	-0,2228
		Volumen de orina de Extracto acuoso (400 mg/kg)	-5,06667*	0,37812	0.000	-6,1772	-3,9562
		Volumen de orina de Extracto acuoso (800 mg/kg)	-2,95000*	0,37812	0.000	-4,0605	-1,8395
	Volumen de orina de Extracto acuoso (200 mg/kg)	Volumen de orina de Extracto acuoso (50 mg/kg)	3,38333*	0,37812	0.000	2,2728	4,4938
		Volumen de orina de Extracto acuoso (100 mg/kg)	1,33333*	0,37812	0.013	0,2228	2,4438
		Volumen de orina de Extracto acuoso (400 mg/kg)	-3,73333*	0,37812	0.000	-4,8438	-2,6228
		Volumen de orina de Extracto acuoso (800 mg/kg)	-1,61667*	0,37812	0.002	-2,7272	-0,5062
	Volumen de orina de Extracto acuoso (400 mg/kg)	Volumen de orina de Extracto acuoso (50 mg/kg)	7,11667*	0,37812	0.000	6,0062	8,2272
		Volumen de orina de Extracto acuoso (100 mg/kg)	5,06667*	0,37812	0.000	3,9562	6,1772
		Volumen de orina de Extracto acuoso (200 mg/kg)	3,73333*	0,37812	0.000	2,6228	4,8438
		Volumen de orina de Extracto acuoso (800 mg/kg)	2,11667*	0,37812	0.000	1,0062	3,2272
	Volumen de orina de Extracto acuoso (800 mg/kg)	Volumen de orina de Extracto acuoso (50 mg/kg)	5,00000*	0,37812	0.000	3,8895	6,1105
		Volumen de orina de Extracto acuoso (100 mg/kg)	2,95000*	0,37812	0.000	1,8395	4,0605
		Volumen de orina de Extracto acuoso (200 mg/kg)	1,61667*	0,37812	0.002	0,5062	2,7272
		Volumen de orina de Extracto acuoso (400 mg/kg)	-2,11667*	0,37812	0.000	-3,2272	-1,0062

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La prueba Post Hoc Tukey para comparación múltiple del volumen de orina en el extracto acuoso con dosis de 50, 100, 200, 400, 800 mg/kg, indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los controles de volumen de orina en extracto acuoso, lo cual se corrobora con el nivel de significancia, $< 0,05$.

- **Prueba Tukey**

Tabla 37. Promedio de Volumen de Orina

Grupo de tratamiento		N	Subconjunto para alfa = 0,05				
			1	2	3	4	5
HSD Tukey^a	Volumen de orina de Extracto acuoso (50 mg/kg)	6	3,3167				
	Volumen de orina de Extracto acuoso (100 mg/kg)	6		5,3667			
	Volumen de orina de Extracto acuoso (200 mg/kg)	6			6,7000		
	Volumen de orina de Extracto acuoso (800 mg/kg)	6				8,3167	
	Volumen de orina de Extracto acuoso (400 mg/kg)	6					10,4333
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Tukey B^a	Volumen de orina de Extracto acuoso (50 mg/kg)	6	3,3167				
	Volumen de orina de Extracto acuoso (100 mg/kg)	6		5,3667			
	Volumen de orina de Extracto acuoso (200 mg/kg)	6			6,7000		
	Volumen de orina de Extracto acuoso (800 mg/kg)	6				8,3167	
	Volumen de orina de Extracto acuoso (400 mg/kg)	6					10,4333

Se visualizan las medias para los grupos de tratamiento en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

En la prueba de Tukey para el indicador de grupo de extracto acuoso, arrojó la agrupación de cinco subconjuntos relacionados para las medias de volumen de orina de extracto acuoso, siendo que para cada subconjunto se considera un solo grupo de muestra, diferenciado por medias de cantidad de mg/kg que fluctúan en diferencias de promedio de 2 mg/kg.

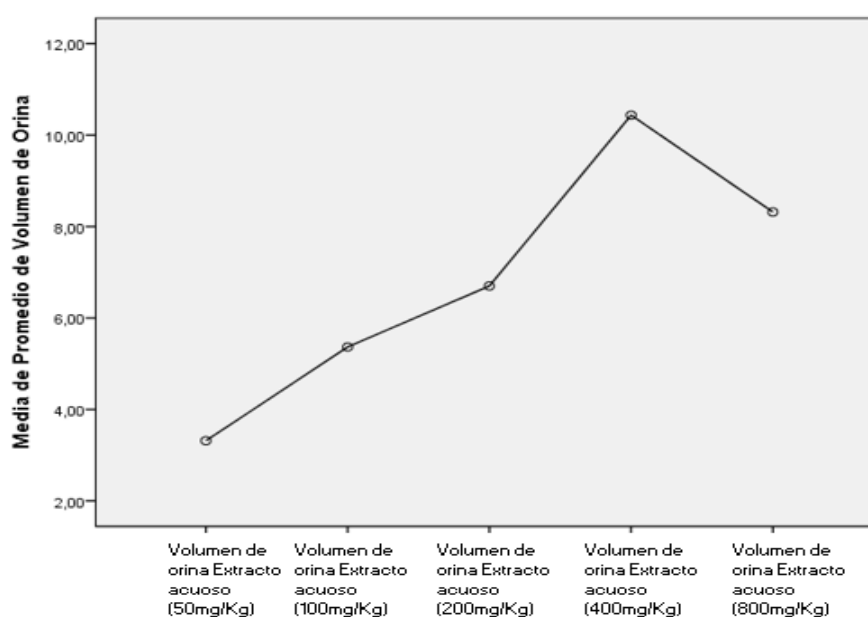


Fig. 15. Promedio de volumen de orina vs Dosis de extracto acuoso

4.4.3. Análisis Estadístico Grupo de Control Extracto Etanólico

Tabla 38. Promedio de volumen de orina

Descriptivos								
Promedio de Volumen de Orina								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)	6	10,750	1,25499	0,51235	9,4330	12,0670	8,70	12,00
Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	6	3,0167	0,64627	0,26384	2,3384	3,6949	2,00	3,80
Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	6	5,9833	0,51929	0,21200	5,4384	6,5283	5,30	6,80
Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	6	6,6667	0,51640	0,21082	6,1247	7,2086	6,00	7,40
Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	6	9,7333	0,41793	0,17062	9,2947	10,1719	9,00	10,10
Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	6	9,9333	1,87154	0,76405	7,9693	11,8974	7,20	13,00
Total	36	7,6806	2,91428	0,48571	6,6945	8,6666	2,00	13,00

- **ANOVA de un Factor**

Tabla 39. Anova de un factor en extracto etanólico

ANOVA					
Promedio de Volumen de Orina					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	266,225	5	53,245	51,475	0,000
Dentro de grupos	31,032	30	1,034		
Total	297,256	35			

Los resultados para el análisis de la Prueba de Anova del Factor de volumen de orina en el extracto etanólico, realizados bajo el programa SPSS, en las dosis de control positivo furosemida (20 mg/kg), y volumen de orina de 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg y 800 mg/kg, determinó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, con un resultado de F (Distribución de Probabilidad Continua) por 51,475 y una significancia de $0,000 < 0,05$; por tanto es necesario realizar la prueba de Tukey.

- Prueba Post Hoc Tukey

Tabla 40. Comparaciones múltiples

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente:							
(I) Grupo de tratamiento			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	Control Positivo - Furosemi da (20mg/kg)	Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	7,73333*	0,58719	0,000	5,9473	9,5193
		Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	4,76667*	0,58719	0,000	2,9807	6,5527
		Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	4,08333*	0,58719	0,000	2,2973	5,8693
		Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	1.01667	0,58719	0,523	-0,7693	2,8027
		Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	0.81667	0,58719	0,732	-0,9693	2,6027
	Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)	-7,73333*	0,58719	0,000	-9,5193	-5,9473
		Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	-2,96667*	0,58719	0,000	-4,7527	-1,1807
		Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	-3,65000*	0,58719	0,000	-5,4360	-1,8640
		Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	-6,71667*	0,58719	0,000	-8,5027	-4,9307
		Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	-6,91667*	0,58719	0,000	-8,7027	-5,1307
	Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)	-4,76667*	0,58719	0,000	-6,5527	-2,9807
		Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	2,96667*	0,58719	0,000	1,1807	4,7527
		Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	-0.68333	0,58719	0,850	-2,4693	1,1027
		Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	-3,75000*	0,58719	0,000	-5,5360	-1,9640
		Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	-3,95000*	0,58719	0,000	-5,7360	-2,1640
	Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)	-4,08333*	0,58719	0,000	-5,8693	-2,2973
		Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	3,65000*	0,58719	0,000	1,8640	5,4360
		Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	0.68333	0,58719	0,850	-1,1027	2,4693
		Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	-3,06667*	0,58719	0,000	-4,8527	-1,2807
		Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	-3,26667*	0,58719	0,000	-5,0527	-1,4807
	Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)	-1.01667	0,58719	0,523	-2,8027	0,7693
		Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	6,71667*	0,58719	0,000	4,9307	8,5027
		Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	3,75000*	0,58719	0,000	1,9640	5,5360
		Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	3,06667*	0,58719	0,000	1,2807	4,8527
		Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	-0,20000	0,58719	0,999	-1,9860	1,5860
	Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)	-0,81667	0,58719	0,732	-2,6027	0,9693
		Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	6,91667*	0,58719	0,000	5,1307	8,7027
		Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	3,95000*	0,58719	0,000	2,1640	5,7360
		Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	3,26667*	0,58719	0,000	1,4807	5,0527
		Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	0,20000	0,58719	0,999	-1,5860	1,9860

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La prueba Post Hoc Tukey para comparación múltiple del volumen de orina con extracto etanólico en las dosis control positivo furosemida (20 mg/kg), y volumen de orina de 50, 100, 200, 400, 800 mg/kg, indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los controles de volumen de orina en extracto acuoso, lo cual se corrobora con el nivel de significancia, $< 0,05$, siendo la no existencia de diferencias significativas, las que existen entre grupos control positivo con furosemida (20 mg/kg), y volumen de orina 400 mg/kg y 800 mg/kg, además se presenta este mismo resultado entre los controles de extracto etanólico entre volumen de orina 400 mg/kg y 800 mg/kg.

- **Prueba Tukey**

Tabla 41. Promedio de volumen de orina – Prueba de Tukey

Promedio de Volumen de Orina					
Grupo de tratamiento		N	Subconjunto para alfa = 0,05		
			1	2	3
HSD Tukey ^a	Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	6	3,0167		
	Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	6		5,9833	
	Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	6		6,6667	
	Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	6			9,7333
	Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	6			9,9333
	Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)	6			10,7500
	Sig.		1,000	0,850	0,523
Tukey B ^a	Volumen de orina de Extracto etanólico (50 mg/kg)	6	3,0167		
	Volumen de orina de Extracto etanólico (100 mg/kg)	6		5,9833	
	Volumen de orina de Extracto etanólico (200 mg/kg)	6		6,6667	
	Volumen de orina de Extracto etanólico (400 mg/kg)	6			9,7333
	Volumen de orina de Extracto etanólico (800 mg/kg)	6			9,9333
	Control Positivo - Furosemida (20mg/kg)	6			10,7500

Se visualizan las medias para los grupos de tratamientos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

En la prueba de Tukey el indicador de grupo de control extracto acuoso, arrojó la agrupación de tres subconjuntos relacionados para las medias de volumen de orina de extracto etanólico, siendo el subconjunto 1 solo el grupo de control de orina, con extracto etanólico de 50 mg/kg, con una media de 3,0167; mientras que el subconjunto 2 estaría conformado por los grupos de control de orina, con extractos

etanólico de 100 y 200 mg/kg con medias de volumen entre los 5,983 mL y 6,667 mL, finalmente el subconjunto 3, lo conformarían los grupos de control de orina, con extracto etanólico de 400 y 800 mg/kg y el Control Positivo - Furosemida (20mg/kg), con medias de volumen entre los 9,733 mL y 10,75 mL.

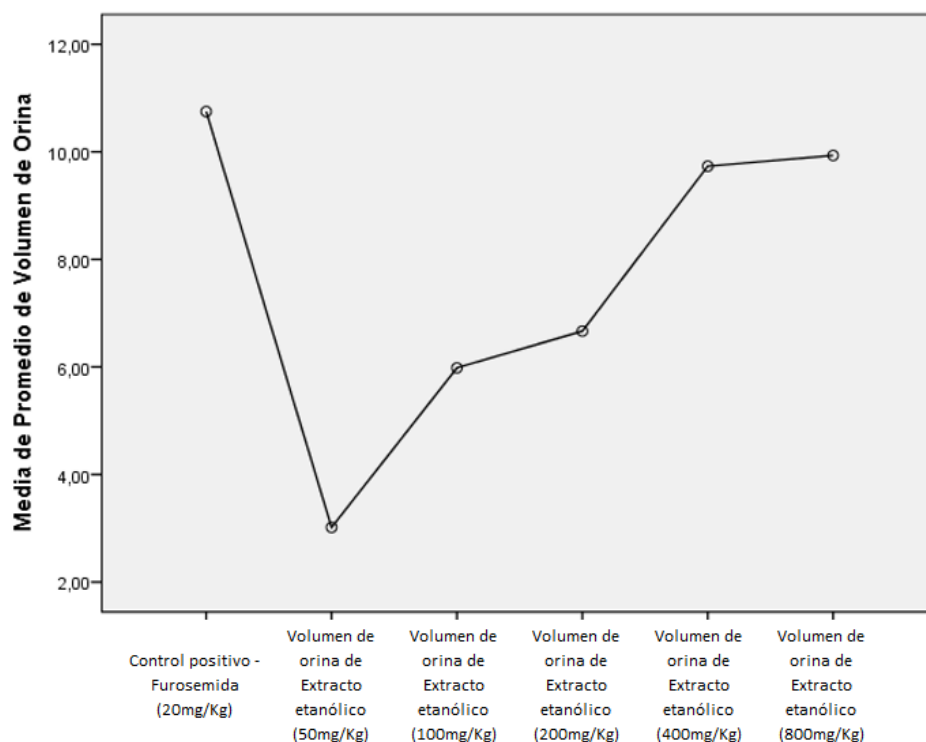


Fig. 16. Promedio de volumen de orina vs Dosis de extracto etanólico.

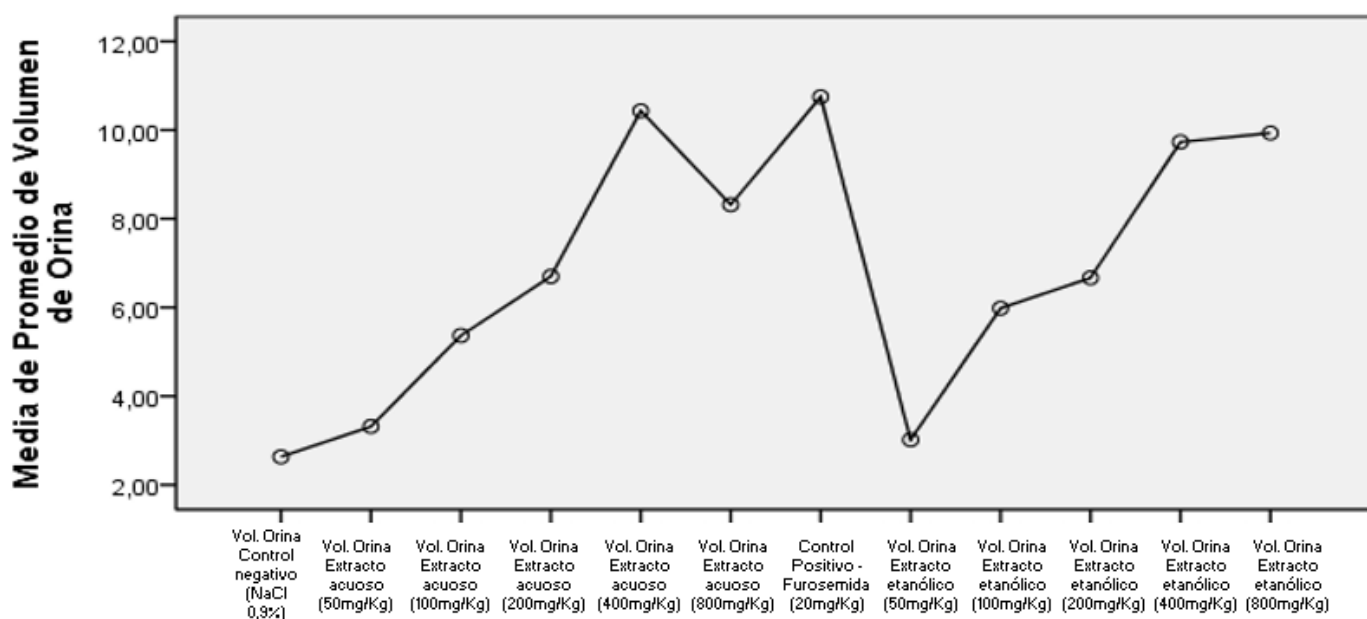


Fig. 17. Resumen de volúmenes de orina de ambos extractos.

V: DISCUSIÓN

La presencia de componentes fitoquímicos (tabla 16) encontrados en las hojas de guayusa como alcaloides, fenoles, azúcares reductores, saponina, glucósidos y quinonas, como se manifiesta en los resultados obtenidos en una muestra de la planta de manera cualitativa (ANEXO 03). Este resultado coincide con los parámetros descritos por Shekshavali, T. et al. (2017), en su estudio de actividad diurética de las hojas de *Abutilon indicum* y *Amaranthus spinusus* (14) donde se identificó la presencia de saponinas, terpenoides y flavonoides; siendo estos metabolitos los posiblemente involucrados en los efectos farmacológicos encontrados en el extracto de las hojas de guayusa. Para la evaluación del efecto diurético de las hojas de guayusa, los extractos fueron administrados vía oral, dado que es la más utilizada de forma tradicional por los pobladores amazónicos. Además, se comparó con el producido por la furosemida, diurético del asa ampliamente utilizado en la práctica clínica. El tratamiento previo de los animales con una carga de solución salina representa una ventaja y es necesaria para poder producir un mejor grado de diuresis. Como todos los diuréticos son utilizados para el tratamiento del edema, es de suma importancia demostrar su efectividad en presencia de exceso de líquido. De esta manera el exceso de solución salina suministrado a los animales, simula estas condiciones edematosas. Tal como lo descrito por Oré JJ (2015) en su trabajo de Efecto diurético hidroalcohólico de hojas de *Aenium arboreum* “rosa verde” donde utiliza la furosemida como Control positivo y trata previamente a las ratas de experimentación y que finalmente se obtuvo buenos resultados de efecto diurético en las hojas de rosa verde (30) Además, el trabajo de Bastidas F. et al. (2016), también utilizó la furosemida como control positivo en su trabajo del estudio de efecto diurético de hojas *Maytenus macrocarpa* “Chuchuhuasi”. (31) y al no tener diferencia significativa en los resultados de volumen de orina, también se realizó la Prueba de Tukey al igual que la presente investigación para poder tener una prueba de la diuresis de ambas plantas medicinales. Los resultados del efecto diurético de las hojas de guayusa fueron obtenidos según la metodología descrita, luego de la administración de la solución salina y el extracto a cada grupo de tratamiento, se recolectaron muestras de orina a la 1, 2, 4 y 6 horas después de iniciado el experimento. Dichos resultados se pueden observar en las tablas 17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27 y 28 . En relación al grupo de tratamiento con el diurético de referencia (furosemida), se observó un

pico máximo similar de excreción a las dosis de 400 mg/kg tanto para el extracto acuoso como etanólico (figura 12). Si bien es cierto, la media de los volúmenes reportados por ambos grupos de tratamiento (10,43 mL y 9,93 mL respectivamente) son superiores en volúmenes reportados en anteriores trabajos de investigación de efecto diurético como el reportado por Bastidas F. et al. (2016), quien tuvo volumen de pico máximo de 5,17 mL de orina en 24 horas en su trabajo del estudio de efecto diurético de hojas *Maytenus macrocarpa* “Chuchuhuasi”(31). Ello quiere decir que el efecto diurético de las hojas de *Ilex guayusa* Loes es superior a las hojas de “chuchuhuasi”.; sin embargo, presentó menor volumen de orina y por lo tanto menor efecto diurético que lo reportado por Hozaien, H. et al. (2018) en su trabajo de actividad diurética del extracto etanólico de *Panicum repens* en ratas, pues tuvo resultados de 22 mL de orina total a dosis de 500 mg/kg. A la sexta hora la diuresis disminuyó considerablemente en el grupo control y los grupos de tratamiento con los extractos (figura 12), ello debido a que la furosemida tiene una acción corta. Los resultados al término de las 6 primeras horas para el caso del control negativo con solución salina cloruro de sodio al 0,9%, el volumen promedio de orina total fue de 2,63 mL, mientras que el mayor volumen promedio de orina total por tratamiento se encuentran en extracto etanólico con 7,06 mL, seguido del control positivo con un volumen promedio total de furosemida de 10,75 mL de orina, pues la furosemida mostró tener mayor actividad diurética, como es de esperar, y el extracto acuoso con 6,82 mL de volumen promedio total por tratamiento, muy superior al control negativo y muy cerca del valor obtenido del volumen promedio del extracto etanólico. (31) En el caso del resultado obtenido en los extractos, etanólico y acuoso, no existe una diferencia significativa si observamos la media del volumen total de orina de ambos grupos de tratamiento; sin embargo, se puede observar que en los subgrupos de los extractos si existe una diferencia significativa (tabla 29). La dosis de 50, 100, 200 mg/kg de los extractos acuoso mostraron un efecto diurético significativo con volúmenes promedio de 3,31 mL, 5,36 mL, 6,70mL; y extracto etanólico con las mismas dosis también mostró un efecto diurético con volúmenes promedio de 3,01mL, 5,98mL y 6,66mL respectivamente en comparación con el grupo control negativo con solución fisiológica (NaCl 0,9%) que tuvo un volumen promedio de 2,63mL (figura 11). Al comparar estos resultados con el trabajo de Varillas, A. y Ttito, D. (2018) en su investigación de actividad diurética en extracto etanólico de hojas matico (15), se observó que los volúmenes eliminados en las 6 horas de tratamiento, la furosemida fue mayor a los grupos de tratamiento con el

extracto etanólico, teniendo resultados similares al efecto diurético de las hojas de guayusa.

El grupo de tratamiento del extracto acuoso a dosis de 400 mg/kg, tuvo como volumen promedio de orina total de 10,43 mL a las 6 horas de iniciado el experimento (figura 12), mientras que en el grupo de tratamiento del extracto etanólico, el pico más alto del volumen promedio de orina total fue de 9,93 mL a las 6 horas de iniciado el experimento, a dosis de 800 mg/kg (tabla 29). Con dicha comparación de resultados de los volúmenes promedio de ambos grupos de tratamientos, en comparación con el grupo control negativo se puede comprobar el efecto diurético en ambos extractos. En el experimento la furosemida ocasionó un efecto diurético marcado en comparación con los grupos de tratamiento con los extractos con las hojas de *Ilex guayusa* Loes con marcada superioridad en la segunda y tercera hora de la recolección de orina. La acción diurética del extracto de guayusa tiene un tiempo de latencia mayor en contraste con la furosemida en algunos casos, ello se puede deber a factores farmacocinéticas o farmacodinámicos. Es de destacar también que a medida que, con el incremento de los niveles de dosis de extracto de la planta, el volumen eliminado también fue superior, resultado que nos habla de una posible respuesta dependiente de la dosis, excepto la dosis de 800 mg/kg de extracto acuoso donde el resultado de orina disminuyó en comparación a la dosis de 400mg/kg también de extracto acuoso, donde el volumen aumentó a medida que iba aumentando la dosis (tabla 29).

El efecto diurético de la hoja de *Ilex guayusa* Loes, quedó demostrado al existir una respuesta diurética positiva en las dosis ensayadas: En la figura 12 se demostró que la concentración de 400 mg/kg de extracto acuoso y dosis de 400 mg/kg de extracto etanólico produjeron significativamente un volumen similar de orina en 6 horas comparable al de la furosemida. Al comparar con el trabajo de Alviz, A. et al. (2013) en su trabajo de Efecto diurético agudo de extractos etanólico y acuoso de *Cerapteris pteroides* (Hook) el efecto diurético se reportó a la concentración de 500 mg/kg para ambos extractos, similar a la concentración de 400 mg/kg para ambos extractos del presente estudio. (32) Caso contrario sucedió en el trabajo de Bonifaz, N. (2018) en su trabajo de actividad diurética del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Persea americana* Mill palta fuerte que tuvo su mayor efecto diurético a los 100 mg/kg. De lo anteriormente tratado se deduce el efecto diurético de las hojas de *Ilex guayusa* Loes si se tiene presente que se está comparando con un diurético de techo alto como la furosemida, se comprueba también lo descrito en la tabla 32

la actividad diurética que más se acerca al grupo de control positivo con valor 1,0, es la dosis de 400 mg/kg de extracto acuoso con valor 0,97. Cabe mencionar además que para contrastar las hipótesis se sometió a un análisis de una prueba de homogeneidad de varianzas, se obtuvo como resultado que en las poblaciones en los cuatro grandes tratamientos (Tabla 33), el p-valor es menor que 0,05 (a un nivel de confianza del 95%), por lo que se concluye que, en las poblaciones definidas por los cuatro grandes grupos de tratamientos, las varianzas de volumen total de orina no son iguales. Debido a que hay una gran variedad de factores; incluyendo prácticas agrícolas previo a la recolección, altitud de cada planta y, mecanismo de degradación, ubicación geográfica de crecimiento, origen geográfico, temporada de recolección, variación de exposición a la luz solar durante el traslado, madurez de las hojas durante el tratamiento previo a la obtención de los extractos y demás, es preciso realizar estudios sobre la estabilidad de las hojas de guayusa considerando los parámetros antes mencionados. La infusión acuosa proporciona un efecto diurético similar al presentado por el extracto obtenido por maceración con etanol (extracto etanólico), lo cual sugiere que el uso de la infusión en la medicina popular, tal como se realiza actualmente, es adecuado y no es necesario reemplazarlo por un método de extracción química más costosa. Si bien ambos extractos no se encuentran en el techo farmacológico de la furosemida; constituyen una base científica que apoya el uso diurético tradicionalmente dado a esta especie en poblaciones awajún de la selva oriental del Perú. Dado que no existen en la región sea a nivel nacional o internacional, estudios realizados respecto al efecto diurético de las hojas de *Ilex guayusa* Loes. El efecto diurético observado en los extractos de la planta *Ilex guayusa* Loes está relacionado con la presencia de estos constituyentes y se requieren posteriores estudios experimentales encaminados a la identificación de los componentes responsables de la actividad con posterior estudio de estudio cuantitativo y ver el componente responsable de su actividad farmacológica, además de profundizar en el entendimiento de los mecanismos de acción involucrados.

VI: CONCLUSIONES

- Se obtuvo tanto los extractos acuoso y etanólico a partir de las hojas de *Ilex guayusa* Loes se a partir de 410,25 g de peso seco con un rendimiento de 47,78%.
- La dosis de 400 mg/kg del extracto acuoso y las dosis de 400 mg/kg y 800 mg/kg del extracto etanólico son los que tienen mejor efecto diurético según lo observado en el volumen de orina de las ratas albinas de experimentación.
- El grupo control positivo (furosemida), produce un mejor efecto diurético en las ratas reflejado con un volumen de orina superior, en contraste con los extractos acuoso (400 mg/kg) y etanólico (400 mg/kg y 800 mg/kg).
- El grupo control negativo (cloruro de sodio al 0,9%) produce un menor efecto diurético en las ratas albinas hembras en comparación con los demás grupos de tratamiento con el extracto de *Ilex guayusa* Loes (guayusa).

VII: RECOMENDACIONES

- Realizar estudios complementarios como determinación de dosis de toxicidad, tanto aguda como crónica, determinar la Dosis Letal Media (DL50) en las extracciones entre 500 mg/kg a 1000 mg/kg, tanto en extracto acuoso como etanólico.
- Se sugiere realizar un estudio para la determinación de la dosis exacta de efecto diurético de las hojas de *Ilex guayusa* Loes entre las dosis 250 mg/kg a 550 mg/kg, tanto de extracto acuoso como extracto etanólico.
- El resultado de esta investigación puede ser beneficiosa para la salud si se propala entre la población. Asimismo, el estudio científico de esta planta no solo cimentará las bases para el desarrollo de fármacos y compuestos similares, sino que permitirá entender la razón de su uso tan prolongado en el tiempo, y con esto promover su uso y conservación.
- Debido a que el conocimiento fitoquímico de las hojas de *Ilex guayusa* Loes es limitado y la literatura científica es escasa; es necesario una profunda investigación científica y poder evaluar su actividad biológica y/o farmacéutica para su uso clínico posterior.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Inoue M, Hayashi S, Craker LE. Role of Medicinal and Aromatic Plants: Past, Present, and Future. En: Perveen S, Al-Taweel A, editores. Pharmacognosy - Medicinal Plants [Internet]. 1ª ed. InTech (US); 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.5772/intechopen.82497>
2. OMS. Hipertensión [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2019 [citado 28 de enero de 2020]. p. 1. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
3. INEI. Perú [Internet]. Enfermedades no transmisibles y trasmisibles 2017 [citado 20 de mayo de 2018]. . 1ª ed. Lima: INEI;188 p. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1526/libro.pdf
4. OMS/OPS. Día Mundial de la Salud: Uno en tres adultos en las Américas tiene hipertensión, el principal factor de riesgo para morir por una enfermedad cardiovascular [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2013 [citado 28 de enero de 2013]. p.1.Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8466:2013-world-health-day-americas-one-three-adults-hypertension-death-cardiovascular&Itemid=1926&lang=es
5. WHO traditional medicine strategy: 2002--2005. Geneva: WHO; 2001.
6. Radice M, Vidari G. Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. La granja [Internet]. 2007 [citado 30 de octubre de 2007];1(6):3–11. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047390002.pdf>
7. Shemluck M. The flowers of Ilex guayusa. Botanical Museum Leaflets. Bot Museum Leafl Harvard University [Internet]. 1979 [citado 10 de junio de 1979];27(5):155–60. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/41762819>
8. Younis W, Alamgeer, Schini-Kerth VB, Brentan da Silva D, Junior AG, Bukhari IA, et al. Role of the NO/cGMP pathway and renin-angiotensin system in the hypotensive and diuretic effects of aqueous soluble fraction from Crataegus songarica K. Koch. J Ethnopharmacol [Internet]. 2019 [citado 01 de marzo de 2020];249:112400. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112400>
9. Reddy PS, Sowmya B, Sravani N, Sandhya P, Mohan CK. Evaluation of diuretic potential of petroleum ether extract of Dendrophthoe falcata leaves in

- wistar rats. Asian J Pharm Pharmacol [Internet]. 2019 [citado 26 de marzo de 2019];5(6):1086–90. Disponible en: <http://ajpp.in/uploaded/p386.pdf>
10. Yakubu MT, Oyagoke AM, Quadri LA, Agboola AO, Oloyede HOB. Diuretic activity of ethanol extract of *Mirabilis jalapa* (Linn.) leaf in normal male Wistar rats. J Med Plants Econ Dev [Internet]. 2019 [citado 26 de agosto de 2019]; 3(1):1–7. Disponible en: <https://jomped.org/index.php/jomped/article/view/70/229>
 11. Salazar-Gómez A, Pablo-Pérez SS, Estévez-Carmona MM, Meléndez-Camargo ME. Diuretic activity of aqueous extract and smoothie preparation of *verbena crocata* in rat. Bangladesh J Pharmacol. 2018;13(3):236–40.
 12. Hozaien HE, El-Tantawy WH, Temraz A, El-Gindi OD, Taha KF. Diuretic activity of ethanolic extract of *Panicum repens* L. roots and rhizomes. Nat Prod Res [Internet]. 2018 [citado 08 de febrero de 2018] ;6419:1–2. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1437440>
 13. Nayak BS, Ellaiah P, Dinda SC, Moharana BP. Diuretic Activity Of Flavonoid Compound Isolated From *Gmelina arborea* Fruits Extract. Eur J Pharm Med Res [Internet]. 2017[citado 26 de enero de 2017] ;4(2):616–22. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/12fd/75549b265dbb285970419a2493e399bc59b5.pdf>
 14. Shekshavali T, Roshan S. Evaluation for Diuretic Activity of *Abutilon indicum* and *Amaranthus spinosus* Leaves Extracts. Res Rev a J Toxicol [Internet]. 2017[citado 20 de mayo de 2017] ;7(2):12–5. Disponible en: <http://medicaljournals.stmjournals.in/index.php/RRJoT/article/view/36>
 15. Varillas AR, Tito DMA. Actividad diurética del extracto etanólico de las hojas de *Buddleja globosa* en ratas [Internet]. Inca garcilaso de la vega; 2018. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/4159>
 16. Bonifaz ND. Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de la *Persea americana* Mill “palta fuerte” [Internet]. Universidad norbert wiener; 2018 [citado 20 de febrero de 2019] Disponible en: <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/1864>
 17. Dueñas JF, Jarrett C, Cummins I, Logan–Hines E. Amazonian *Guayusa* (*Ilex guayusa* Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. Econ Bot [Internet]. 2016;70(1):85–91. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12231-016-9334-2>
 18. Katzung BG, Master SB, Trevor AJ. Farmacología básica y clínica. 11ª ed.

- Mexico df: Mc graw-hill; 2010. 1218 p.
19. Hall J. Tratado de fisiología médica. 12th ed. Barcelona: Elsevier España; 2011. 1092 p.
 20. Sekine T, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol - Ren Physiol* [Internet]. 2006;290(2):251–61. Disponible en: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00439.2004>
 21. Pallone TL, Zhang Z, Rhinehart K. Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am J Physiol - Ren Physiol* [Internet]. 2003;284(2):53–2. Disponible en: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00304.2002>
 22. Meltzer JS. Renal Physiology. En: Hemmings HC, Egan TD, editores. *Pharmacology and Physiology for Anesthesia* [Internet]. 2ª ed. Elsevier Inc.; 2019. p. 782–94. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48110-6.00040-5>
 23. Bruton L, Chabner B, Knollman B. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª ed. Mexico: Mc graw-hill; 2012. 2066 p.
 24. Lorenzo P, Moreno A, Leza JC. Velásquez-Farmacología Básica y Clínica. 17ª ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana; 2004. 1404 p.
 25. Florez J. Farmacología humana. 6ª ed. Armijo JA, Mediavilla A, editores. Barcelona: Elsevier; 2014. 1216 p.
 26. Flores-Villegas B, Flores-Lazcano I, Lazcano-Mendoza M. Edema Enfoque Clínico. *Med Int Mex* [Internet]. 2014;30:51–5. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2014/mim141g.pdf>
 27. Diario oficial EL PERUANO. Ley de Protección y Bienestar animal. Lima; 2016.
 28. Pallas A. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 3ª ed. Madrid: Elsevier; 2003. 393 p.
 29. Lewis WH, Kennelly EJ, Bass GN, Wedner HJ, Elvin-Lewis MP, W. DF. Ritualistic use of the holly Ilex guayusa by Amazonian Jivaro Indians. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1991;33(1–2):25–30. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90156-8](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(91)90156-8)
 30. Oré JJ. Efecto diurético y dosaje de electrolitos del extracto hidroalcohólico de las hojas de Aenium arboreum (L). Webb.&Berth. “rosa verde” en Cavia porcellus “Cobayo”. Ayacucho - 2015 [Internet]. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga; 2015. Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1168>

31. Bastidas F, Huaccho JJ, Chambi J, Padilla A, Aguirre L, Salazar A, et al. Efecto diurético de las hojas de *Maytenus macrocarpa* Chuchuhuasi en ratas albinas. *Cienc E Investig MÉDICO Estud Latinoam* [Internet]. 2016 [citado 01 de agosto de 2017];21(1):14–8. Disponible en: <https://www.cimel.felsocem.net/index.php/CIMEL/article/view/598>
32. Alviz AA, Salas RD, Franco LA. Efecto diurético agudo de los extractos etanólico y acuoso de *Ceratopteris pteridoides* (Hook) en ratas normales. *Biomédica* [Internet]. 2013 [citado 01 de marzo de 2017];33(1):115–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i1.611>

ANEXO 01

José Ricardo Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Tel: 017512863 - RPM #963689079
e-mail: iocamde@gmail.com



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

Certifica:

Que, el Bachiller, ERAZO AZURÍN ANDY RICHARD, egresado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con la finalidad de desarrollar la tesis: Efecto Diurético de los Extractos Etanólico y Acuoso de *Ilex guayusa* Loes (guayusa) en Ratas Albinas Hembras. Ha solicitado la certificación botánica de una planta procedente del Dpto. Cajamarca. Prov. San Ignacio. Dto. Namballe. Loc: La Colmena, donde es conocida con el nombre vulgar de “guayusa”, la muestra fértil con flores y frutos se ha identificado como *Ilex guayusa* Loes. Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnolopsida
SUBCLASE	: Rosidae
ORDEN	: Celastrales
FAMILIA	: Aquifoliaceae
GENERO	: <i>Ilex</i>
ESPECIE	: <i>Ilex guayusa</i> Loes.

Nombre vulgar: “guayusa”

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 04 de abril del 2017



José Ricardo Campos de la Cruz
José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

IR SANCHEZ SILVA 156 PISO 2 – URB. SANTA LIZMILLA – LIMA 07

ANEXO 02



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS
COORDINACIÓN DE BIOTERIO

CERTIFICADO SANITARIO Nº

009-2017

Producto	: Rata Albina	Lote Nº	: R - 01- 2017
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad	: 72
Cepa	: Holtzman	Edad	: 2 meses ½
Peso	: 200 a 250 gr.	Sexo	: hembras
G.R.	: 033766	Destino	: Erazo Azurín, Andy Richard
Lima	: 13-01-2017		

El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo **Rosales Fernández**. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.

*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.

Chorrillos, 13 de Enero del 2017
(Fecha de atención y emisión del certificado)

NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.


M.V. Arturo Rosales Fernández
C.M.V.P. 1586

ANEXO 03



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00041-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 004349/2017
SOLICITADO POR : ANDY ERAZO
MUESTRA : ILLEX GUAYOSA LOESS
NÚMERO DE LOTE : ---
CANTIDAD : 250g
FECHA DE RECEPCIÓN : 05 de Enero del 2017

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
TAMIZAJE FITOQUÍMICO			
AZÚCARES REDUCTORES	Reacción de Fehling	Cualitativo	+
	Reacción de Molish	Cualitativo	+
FENOLES	Reacción con tricloruro férrico	Cualitativo	+
TANINOS	Reacción con tricloruro férrico	Cualitativo	+
	Reacción con solución de gelatina	Cualitativo	+
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	Cualitativo	+
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	Cualitativo	+
	Reacción de Mayer	Cualitativo	+
	Reacción de Wagner	Cualitativo	+
ANTOCLANINAS	Reacción con Alcohol amílico	Cualitativo	-
LACTONAS	Reacción de Baljet	Cualitativo	+
TRITERPENOS	Reacción de Lieberman - Burchard	Cualitativo	+
SAPONINAS	Reacción de espuma	Cualitativo	+
ESTEROIDES	Reacción de Lieberman - Burchard	Cualitativo	+
CATEQUINAS	Reacción con Carbonato de sodio	Cualitativo	-

Lima, 06 de Febrero del 2017


Q.F. Nelson Bautista Cruz
Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

